

THESIS

GIESSEN

1967

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. H. Blobel

Das Fibrinolysin von Staphylokokken

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
GERD HENTSCHEL
Tierarzt aus Wissen/Sieg

Gießen 1967

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR ROAD
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Blobel

Das Fibrinolysin von Staphylokokken

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
GERD HENTSCHEL
Tierarzt aus Wissen/Sieg

Gießen 1967

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
in Gießen

Dekan: Professor Dr. F. Ulbrich

Berichterstatter: Professor Dr. H. Blobel

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 1967

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1,0 Einleitung	1
2,0 Literaturübersicht	2
3,0 Material und Methoden	14
3,1 Material	14
3,11 Staphylokokken	14
3,12 Medien	15
3,2 Methoden	17
3,21 Fibrinolysinnachweis	17
3,211 Fibrinolysinnachweis auf festen Medien	17
3,212 Fibrinolysinnachweis in flüssigen Medien	18
3,22 Quantitative Bestimmung des Fibrinolysins	18
3,23 Koagulasenachweis und Anreicherung	18
3,231 Nachweismethoden von Koagulase	18
3,232 Darstellung von Koagulase und ihre quantitative Bestimmung	19
3,24 Nachweis der Mannitvergärung	20
3,25 Hämolsinnachweis	20
3,26 Versuch der Antikörperstimulierung durch Fibrinolysin	20
4,0 Ergebnisse	22
4,1 Wahl eines geeigneten Mediums zum Fibrinolysinnachweis	22
4,2 Quantitative Bestimmung des Fibrinolysins	22
4,3 Häufigkeit der Fibrinolysinbildung bei Staphylokokken verschiedener Herkunft	24
4,31 Fibrinolysin-positive Staphylokokken bei Rind, Mensch und Hund	24
4,32 Fibrinolysinbildung bei Staphylokokken von verschiedenen Infektionsherden des Menschen	24
4,4 Einige Merkmale fibrinolysin-positiver Staphylokokken	25
4,41 Koagulasebildung und Mannitvergärung	25
4,42 Fibrinolysin und Koagulase	27
4,43 Fibrinolysin und Hämolsin	29

	Seite
4,5 Produktion von Fibrinolysin	30
4,6 Anreicherung von Fibrinolysin	33
4,7 Temperaturempfindlichkeit von Fibrinolysin	35
4,8 Antikörperstimulierung durch Fibrinolysin	36
5,0 Diskussion	38
6,0 Zusammenfassung	45
7,0 Literaturverzeichnis	47
Anhang (Abbildungen 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11 und 12)	52
Lebenslauf	

1,0 Einleitung

Seit der Jahrhundertwende sind zahlreiche Versuche unternommen worden, Unterschiede zwischen pathogenen und apathogenen Staphylokokken festzustellen, und sie als Merkmale der Pathogenität in die klinische Diagnostik aufzunehmen (ELEK¹⁸, DARANYI¹⁴, SMITH⁴⁸, BLAIR⁵, ROEMER-SCHMITZ⁴⁴). Auf die Staphylokokkenkoagulase wies bereits LOEB³⁴ im Jahre 1903 hin. DARANYI¹⁴ erkannte in der Koagulasebildung ein Differenzierungsmerkmal pathogener gegenüber apathogenen Staphylokokken.

Später wurden dann noch eine ganze Reihe anderer Eigenschaften der Staphylokokken mit ihrer Pathogenität in Beziehung gebracht, zum Beispiel die Mannitvergärung, die Bildung von Hämolsinen, Leukozidin, Hyaluronidase und Fibrinolysin. Schon 1908 beobachtete MUCH³⁹ bei einigen Staphylokokken, daß sie koagulierte Plasma nach einiger Zeit wieder auflösten. KLEINSCHMIDT³⁰ bestätigte diese Beobachtung. Zunächst wurde geglaubt, daß zwischen Koagulase und Fibrinolysin enge Zusammenhänge beständen, und daß diese beiden Substanzen identisch seien. So vermutete man auch in Fibrinolysin ein Pathogenitätsmerkmal der Staphylokokken. Da es aber nicht so häufig wie Koagulase vorkam, wurde es zunächst nicht eingehend untersucht. MADISON³⁶ glaubte, daß die Fibrinolysinbildung fast ausschließlich eine Eigenschaft von Staphylokokken menschlicher Infektionen sei. Er fand nur vereinzelt unter den Staphylokokken tierischer Herkunft fibrinolysin-positive Stämme. Spätere Untersuchungen (TILLET u. GARNER⁵¹, CHRISTIE u. WILSON¹³, ELEK¹⁸, SMITH⁴⁸) zeigten jedoch, daß auch bei vielen tierischen Erkrankungen Staphylokokken mit Fibrinolysinaktivität vorkamen. Der zahlenmäßige Anteil der fibrinolysin-positiven Staph.-Stämme war jedoch bei den verschiedenen Tierarten unterschiedlich (ELEK¹⁸, SMITH⁴⁸).

In der letzten Zeit haben die Staphylokokkeninfektionen in unseren Tierbeständen eine größere Bedeutung erlangt. Die

wirksame Bekämpfung dieser Infektionen setzt eine genaue Analyse der einzelnen Virulenzfaktoren der Staphylokokken voraus. Das Ziel dieser Arbeit war es, einen dieser mutmaßlichen Faktoren, nämlich das Fibrinolysin, eingehender zu untersuchen.

2,0 Literaturübersicht

MUCH³⁹ beschrieb 1908 die Fähigkeit einiger Staphylokokken-Stämme, koaguliertes Plasma nach 24 Stunden wieder aufzulösen. Meistens geschah das in den Fällen, in denen die Koagulation des Plasmas nur langsam voranging oder unvollständig war. Die gleichen Beobachtungen machte ein Jahr später KLEINSCHMIDT³⁰. Er benutzte wie SASKI und FEJGIN⁴⁶ Pferdeplasma zum Nachweis der Fibrinolyse. Er beimpfte das Plasma mit einer Staphylokokkenkultur. Nach anderthalb- bis fünfständiger Bebrütung bei 37 C kam es zur Koagulation des Plasmas und im Verlauf von 4 Tagen zur Auflösung des Koagulums. Nach der Meinung des Autoren sollte die gerinnende und die fibrinolytische Aktivität der Staphylokokken an die lebenden Bakterienzellen gebunden sein, da sie in den entsprechenden Kulturfiltraten nicht nachgewiesen werden konnten.

GONZENBACH und UEMURA²⁶ berichteten dagegen, daß die Fibrinolyseaktivität sowohl bei lebenden, als auch bei durch Erhitzung auf 62 C abgetöteten Bakterien vorhanden war. Nach der Gerinnung des Plasmas innerhalb von 1 bis 3 Stunden erfolgte die Auflösung des Fibrinkoagulums in 3 bis 4 Tagen. Untersuchungen über das Verhalten von Plasmaarten verschiedener Tiere ergaben, daß die Fibrinolyse am schnellsten, innerhalb von 48 Stunden, in koaguliertem Kaninchenplasma eintrat. Geronnenes Hammel- und Ziegenplasma wurde dagegen nicht aufgelöst.

GRATIA²⁷ sah in der Fibrinolyse des Plasmas verschiedener Tiere ebenfalls deutliche Unterschiede. Am schnellsten wurden die Koagula von Hunde-, Kaninchen- und Menschenplasma aufgelöst, dagegen war die Auflösung der Koagula von Hammel- und Ziegenplasma verzögert. GRATIA²⁷ beobachtete bei Hundeplasma eine so schnelle Fibrinolyse, daß die Koagulasewirkung dadurch verschleiert wurde. Plasma, welches zuerst von Koagulase zur Gerinnung gebracht und dann von Fibrinolysin aufgelöst worden war, konnte durch Zufügen von Calcium oder Throm-

bin nicht mehr koaguliert werden. Es schien also kein Fibrinogen mehr vorhanden zu sein.

Wie KLEINSCHMIDT³⁰ konnte auch GENGOU²³ weder Koagulase noch Fibrinolysin in Kulturfiltraten nachweisen. GENGOU²³ stellte Koagulase durch Zentrifugation der Staphylokokkenkulturen und anschließende Erhitzung des Überstandes bei 60 C für 30 Minuten dar. Hierdurch glaubte er, andere noch im Überstand befindliche Stoffe von der Koagulase trennen zu können. Nach seiner Meinung sollten Koagulase und Fibrinolysin an die gleiche Substanz gebunden sein. Die Fibrinolysinaktivität blieb nach seinen Beobachtungen trotz Alter und Austrocknung der Kulturen, sowie Erhitzung auf 100 C während 30 Minuten, erhalten. GENGOU²³ machte die Beobachtung, daß es durch Zugabe von Globulinen zum Plasmaoxalat zwar zur Gerinnung durch Koagulase kam, die Fibrinolyse aber verhindert wurde. Nach Erhitzen auf 61 - 64 C hemmte jedoch das Globulin nicht mehr die Fibrinolyse.

VAN BREUSEGHEM⁵² bestätigte 1934 die Beobachtungen von GRATIA²⁷, nach denen bei Hundeplasma die Fibrinolysininwirkung so intensiv war, daß es gar nicht erst zur Bildung eines Gerinnsels durch Koagulase kam. Ähnliche Ergebnisse ergaben Versuche mit Meerschweinchenplasma. VAN BREUSEGHEM⁵² beimpfte ein Röhrchen Meerschweinchenplasma mit Staphylokokken, ein anderes Röhrchen füllte er nur mit Meerschweinchenplasma. Es kam bei beiden nicht zur Koagulation. Erst die Zugabe von Calcium oder Thrombin bewirkte im Reagenzglas ohne Staphylokokken, aber nicht in dem mit Staphylokokken, eine Gerinnung. Die "verschleierte" Koagulasewirkung konnte durch Aufbewahren der Proben bei 20 C nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von SMITH und HALE⁵⁰ berichtet.

REIMER⁴³ stimmte mit GENGOU²³ darin überein, daß Koagulase und Fibrinolysin an die gleiche "Substanz" gebunden sein sollten. REIMER⁴³ glaubte, daß für die Pathogenität der Staphylokokken die Fibrinolysininwirkung sehr entscheidend sei,

da sie durch Auflösung der Fibrinmäntel eine Ausbreitung der Staphylokokken im Gewebe ermögliche.

TILLET und GARNER⁵¹ beschrieben ausführliche Untersuchungen über die Fibrinolyse bei Streptokokken und stellten am Schluß ihrer Betrachtungen Vergleiche mit der Fibrinolyse bei Staphylokokken an. Bei ihren Untersuchungen beimpften sie ein Gemisch von Fibrinogen und Oxalatplasma, das 1 : 5 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt worden war, mit den Staphylokokkenkulturen. Die Auflösung des entstehenden Koagulums zeigte die Gegenwart von Fibrinolysin an. TILLET und GARNER⁵¹ beobachteten, daß im Gegensatz zu den Streptokokken, bei denen eine Fibrinolyse schon nach 20 Minuten zustande kam, die Fibrinolyse bei den Staphylokokken erst nach 18 bis 24 Stunden begann. Um Verunreinigungen durch andere Bakterien zu vermeiden, benutzten TILLET und GARNER⁵¹ sterile Filtrate. Von 18 untersuchten Staphylokokkenkulturen von Tieren zeigten nur 3 Kulturen Fibrinolyse.

Von 24 Staphylokokkenkulturen tierischer Herkunft, die MADISON³⁶ 1935 untersuchte, war keine Kultur fibrinolytisch. Bei der Prüfung von 145 Staphylokokkenstämmen vom Menschen fand er bei 77 % der Stämme von oberflächlichen Infektionen keine Fibrinolyse, dagegen aber bei 90 % der Stämme von Organinfektionen. Er verwendete Kulturen, die 24 Stunden bei 37 C bebrütet worden waren, verdünnte sie und mischte sie mit Fibrinogen, das er aus Menschenplasma gewann. Die Gerinnung der Fibrinogenlösung erzielte MADISON³⁶ durch Thrombin. Dabei verwendete er die kleinste Thrombinmenge, die Fibrinogen zu Fibrin vollständig umzuwandeln vermochte.

In einer späteren Arbeit berichteten MADISON und DART³⁷ über verschiedene fibrinolytische Faktoren von pathogenen Staphylokokken, jeder dieser Faktoren mit einer gewissen Spezifität für ein bestimmtes Plasma.

MADISON und DART³⁷ beobachteten, daß 80 % der Staphylokokken aus inneren Erkrankungsherden bei Menschen fibrinolysin-positiv waren, dagegen nur 10 % der Staphylokokken aus oberflächlichen Herden. Von den untersuchten Staphylokokken tierischer Herkunft waren 2 von Pferden stammende Staph.-Kulturen fibrinolysin-positiv.

Über ausführliche Untersuchungen von fibrinolytischen Staphylokokken-Stämmen berichtete AOI². Bei der Prüfung von Beziehungen zwischen Koagulase, Fibrinolysin und Hämolysinen stellte er fest, daß von 101 Staph.-Stämmen aus Eiterherden vom Menschen 84 Hämolysine, 88 Koagulase und 89 Fibrinolysin bildeten. 63,4 % der 101 Stämme waren in allen 3 Reaktionen positiv. Bei Kaninchen führten die Stämme, die Hämolysine, Koagulase und Fibrinolysin bildeten, zu ernsteren Erkrankungen als jene, bei denen nur eine oder zwei dieser Substanzen vorhanden waren.

Zum Nachweis der Fibrinolysinaktivität benutzte AOI² sterile Kulturfiltrate. Er beobachtete dabei, daß das Anfangsfiltrat eine geringere Fibrinolysinaktivität hatte als das Endfiltrat. Daraus schloß er, daß ein Teil des Fibrinolysins vom Filter absorbiert worden war. Das Fibrinolysin widerstand einer einstündigen Erhitzung bei 100 C, direktem Sonnenlicht und verschiedenen chemischen Substanzen, wie z.B. 1/4 gesättigtem Chloroform oder Formalin in einer Verdünnung von 1 : 200. Zur Fibrinolysingewinnung bebrütete er die Staphylokokkenskulturen zwischen 5 und 14 Tagen bei 37 C. Eine Anreicherung des Fibrinolysins gelang ihm nach zweimaliger Ausfällung mit Alkohol bei einer Endkonzentration von 75 Prozent oder mit einem gleichen Volumen Aceton. Seren von Kaninchen, die vorher wiederholt mit dem angereicherten Fibrinolysin geimpft worden waren, hemmten die Fibrinolyse. Die Antikörper waren nicht nur gegen das Fibrinolysin eines Stammes gerichtet, sondern hemmten auch die Fibrinolysinwirkung anderer Stämme.

Im Gegensatz zu AOI² berichtete FISHER²⁰ 1936, daß er, außer bei 2 Staphylokokkenstämmen, keine fibrinolytische Aktivität in bakterienfreien Filtraten und Zentrifugaten feststellen konnte. Fibrinolysin wies er einmal durch Auflösung des vorher von Staphylokokken zur Gerinnung gebrachten Plasmas, und zum anderen durch Auflösung des durch Calcium oder Thrombin koagulierten Citratplasmas nach. Von 26 Staphylokokkenkulturen lösten 7 Plasmakoagula auf, die durch Thrombin oder Calcium koaguliert worden waren. Dagegen konnten von den 26 Kulturen 15 Fibrinkoagula wieder auflösen, die vorher durch Staphylokokkenkoagulase koaguliert worden waren. FISHER²⁰ fand keinen fibrinolysin-positiven Staphylokokken-Stamm, der koagulase-negativ war. Die schnellste Lysis sah er bei Verwendung von Menschenplasma. Sie trat hier nach 30 Stunden ein. Mit Kaninchenplasma trat die Lysis erst nach 2 Tagen ein. FISHER²⁰ konnte zwar in Kulturfiltraten kein Fibrinolysin nachweisen, es gelang ihm aber, durch Alkoholausfällung solcher Filtrate, Fibrinolysin anzureichern.

NETER⁴⁰ benutzte die gleiche Methode zum Nachweis der Fibrinolyseaktivität wie TILLET und GARNER⁵¹ und FISHER²⁰. Er beobachtete bei den Staphylokokken eine ähnliche, aber schwächere fibrinolytische Wirkung als bei den Streptokokken. NETER⁴⁰ gewann Seren von Kaninchen, die er vorher mehrmals mit Fibrinolysin geimpft hatte. Mit diesen Seren tränkte er Filterstreifen, die er auf das Fibrinogenmedium legte. Um diese Streifen beobachtete er eine Hemmung der Fibrinolysewirkung. Er führte dies auf Antikörper im Serum zurück.

Im Gegensatz zu GENGOU²³, der Koagulase und Fibrinolysin als einen Stoff ansah, glaubte BIRSCH-HIRSCHFELD⁴ 3 verschiedene Substanzen der Staphylokokken, die mit Plasma in irgendeiner Weise reagierten, festgestellt zu haben, nämlich Koagulase, welche die Gerinnung von Plasma bewirkte, ein Antikoagulans, das die Spontangerinnung des Plasmas hemmte, und Fibrinolysin, welches die Plasmakoagula auflösen konnte. Den Hinweis für ein Antikoagulans glaubte BIRSCH-HIRSCHFELD⁴ darin zu sehen, daß in einigen Fällen trotz vorhandener Koagulase keine

Gerinnung eintrat. Die Koagulasewirkung wurde bei 60 C abgeschwächt und bei Erhitzung auf 80 C inaktiviert. BIRSCH-HIRSCHFELD⁴ konnte Fibrinolysin durch Adsorption an Kaolin und anschließender alkalischer Elution anreichern.

FREDERICQ²² versuchte ohne Erfolg durch Fraktionierung mit Alkohol, Aceton, Chloroform oder durch Hitze Koagulase von Fibrinolysin zu trennen. Eine teilweise Trennung dieser Substanzen erreichte er aber durch Ammoniumsulfat. Bei einer 30%igen Sättigung des Filtrats mit Ammoniumsulfat bildete sich ein Präzipitat, welches Koagulase, aber wenig Fibrinolysin enthielt; bei einer Sättigung von 50 % war weniger Koagulase und bei völliger Sättigung kaum noch Koagulase, dafür aber viel Fibrinolysin vorhanden.

Für CHRISTIE und WILSON¹³ war der Fibrinolysinnachweis nach TILLET und GARNER⁵¹ unzureichend. CHRISTIE und WILSON¹³ benutzten hierfür einen Plattentest. Sie mischten in den Nähragar Menschenoxalatplasma in einer Endkonzentration von 12 % und erhitzten das Gemisch auf 56 C bis eine deutliche Trübung eintrat. Von 141 untersuchten Staph.-Kulturen vom Menschen waren 92 fibrinolysin-positiv und ebensoviele koagulase-positiv. Neunzig der 92 Stämme zeigten α -Hämolysen. Von den 49 fibrinolysin-negativen Stämmen waren 7 koagulase-positiv. Im Gegensatz dazu waren von 57 Stämmen vom Hund nur 5 fibrinolysin-positiv. Von den 52 fibrinolysin-negativen Stämmen waren 39 koagulase-positiv und bildeten entweder β - oder $\alpha + \beta$ -Hämolysine. Der Hämolysinnachweis erfolgte auf Schafblutagar nach den Angaben von BRYCE und ROUNTREE⁸. CHRISTIE und WILSON¹³ beobachteten enge Beziehungen zwischen der β -Hämolysinbildung und dem Fehlen der Fibrinolyse. Interessant war, daß nur eine von 97 fibrinolysin-positiven Staph.-Kulturen koagulase-negativ war. Sie wurde von einer Kuh mit Mastitis isoliert.

Die gleiche Methode des Fibrinolysinnachweises benutzte CHAPMAN⁹. Er stellte eine weitgehende Übereinstimmung von Koagulase- und Fibrinolysinaktivität fest. Von 122 untersuch-

ten Stämmen waren 73 fibrinolysin-positiv. Fünf zeigten nach 14stündiger Bebrütung auf der Platte Lysiszonen mit einem Durchmesser von 2 - 3 mm, 68 dagegen solche mit einem Durchmesser von 6 - 8 mm. CHAPMAN⁹ beobachtete keine Fibrinolyse bei koagulase-negativen Staphylokokken. Einige Jahre später versuchten CHRISTIE et al.¹¹ durch Titration von Staphylokokkenkulturen in doppelten Verdünnungsreihen mit präzipitiertem Fibrinogen eine quantitative Prüfung der Fibrinolysinaktivität. Sie beobachteten nach 24stündiger Bebrütung bei 37 C eine vollständige Auflösung des Fibrins in einer Verdünnung der Kulturfiltrate bis 1 : 160. Dabei stellten sie fest, daß hitzepräzipitiertes Fibrinogen, das durch fibrinolysin-positive Staph.-Stämme aufgelöst worden war, durch Hitze einwirkung nicht mehr präzipitiert werden konnte. Die Fibrinolysinaktivität in den Filtraten wurde durch Erhitzen auf 60 C für 5, 10, 15 und 30 Minuten, sowie bei Erhitzen auf 100 C nicht abgeschwächt. Die ursprünglich von CHRISTIE und WILSON¹³ angenommenen Zusammenhänge zwischen β -Toxin und Fibrinolysin konnten CHRISTIE et al.¹¹ nicht bestätigen.

Nach den 1946 durch CHRISTIE et al.¹² veröffentlichten Ergebnissen von Untersuchungen an Staphylokokken waren von 685 koagulase-positiven Stämmen vom Menschen 651 (95 %) fibrinolytisch. Von 117 koagulase-positiven Staph.-Stämmen von Tieren waren dagegen nur 9 (7,7 %) fibrinolytisch. Die Untersuchungen wurden mit Menschen-, Pferde-, Rinder- und Schafplasma durchgeführt. Von diesen war Schafplasma zum Fibrinolysinnachweis am wenigsten geeignet. Nur ein Stamm gab hier eine positive Fibrinolysinreaktion. Die Autoren glaubten, daß eine schnelle Fibrinolyse die Koagulasewirkung verschleiern könnte.

ROUNTREE⁴⁵ benutzte zur Fibrinolysindarstellung die Methode von CHRISTIE und WILSON¹³. Nach 5tägiger Bebrütung bei 37 C beobachtete sie um die Kolonien auf den Fibrinogenplatten Aufklärungszonen von 30 - 35 mm Durchmesser. Sie untersuchte 34 Staph.-Kulturen menschlicher Herkunft auf Fibrinolysin- und β -Toxinwirkung. Davon waren 31 fibrinolysin-positiv und

β -Hämolysin-negativ. Die restlichen 3 der 34 Kulturen waren fibrinolysin-negativ und produzierten β -Toxin. Eine Hemmung des Fibrinolysins auf Fibrinogenplatten, die vorher mit β -Hämolysin behandelt worden waren, konnte nicht beobachtet werden.

BLAIR⁵ konnte wie ROUNTREE⁴⁵, bis auf wenige Ausnahmen, kein Fibrinolysin bei Staphylokokken nachweisen, die β -hämolytisch waren.

PILLET et al.⁴¹ benutzten zur Darstellung von Fibrinolysin ebenfalls die Plattenmethode nach CHRISTIE und WILSON¹³ und zur quantitativen Bestimmung den Röhrchentest von TILLET und GARNER⁵¹. PILLET et al.⁴¹ bewirkten die Koagulation des Plasmas durch Zufuhr von Calcium. Auf den Plasmakoagula prüften sie verschiedene Bouillonkulturen von Staphylokokken. Bei 82 % der Staph.-Kulturen vom Menschen konnten die Autoren Fibrinolysinaktivität nachweisen. Die Anreicherung von Fibrinolysin gelang ihnen durch Ausfällung mit Trichloressigsäure (nach AOI² und FISHER²⁰ Alkohol oder Aceton). PILLET et al.⁴¹ erhielten eine Suspension, die noch in einer Verdünnung von 1 : 100 Fibrinolysinwirkung zeigte. Bei der Untersuchung auf Hitzestabilität des Fibrinolysins stellten sie bei halbstündigem Erhitzen folgende Aktivitätsminderung fest: bei 50 C 15 %, bei 60 C 30 %, bei 70 C 60 % und bei 100 C 100 %. Diese Beobachtungen stimmten nicht mit den Beobachtungen von CHRISTIE et al.¹¹ überein, die bei einer Erhitzung der Staph.-Kulturen auf 60 C und 100 C keine Abschwächung der Fibrinolysinaktivität feststellen konnten.

Bei der Untersuchung über Beziehungen von Koagulase und Fibrinolysin erzielten GERHEIM et al.²⁵ sowie LACK³² übereinstimmende Ergebnisse. Fibrinolysin und Koagulase waren demnach zwei getrennte Substanzen. Die Koagulasewirkung wurde bei einer 2stündigen Erhitzung der Staph.-Kulturen auf 75 C zerstört, die Fibrinolysinwirkung aber nur unbedeutend beeinflusst.

LACK³² glaubte, daß Staphylokokken, wie auch die Streptokokken, nur eine Kinase für das Proenzym Plasminogen bildeten. Er nannte diese Staphylokinase.

EDSALL¹⁷ stellte in seinen Untersuchungen über Fibrinolysin fest, daß es nicht auf hochgereinigtes Fibrinogen vom Menschen einwirkte. Es mußte vorher eine Euglobulin-Fraktion des Menschenplasmas hinzugefügt werden, durch die die Lysis aktiviert wurde.

CHRISTENSEN¹⁰ stellte in seinen Untersuchungen an Streptokokken fest, daß der lytische Streptokokken-Faktor als Aktivator eines Enzymvorläufers in der Euglobulin-Fraktion des normalen Plasmas vom Menschen wirkte. Er nannte diesen Faktor Plasminogen.

In einem späteren Bericht vermuteten auch SELA und KATCHALSKI⁴⁷ im Falle der Staphylokokken ein Proenzym, Plasminogen (Pro-fibrinolysin), das im Plasma verschiedener Tierarten enthalten sei, und welches durch die Staphylokokken zum wirksamen Fibrinolysin aktiviert werden könnte.

SMITH⁴⁸ berichtete 1947 über Untersuchungen von 110 pathogenen und 63 apathogenen Staphylokokken-Stämmen tierischer Herkunft. Zum Nachweis des Fibrinolysins benutzte er den Röhrchentest von TILLET und GARNER⁵¹, nahm aber anstatt menschlichen Plasmas Schafplasma. Daneben benutzte er noch den Plattentest nach CHRISTIE und WILSON¹³. Keiner der 173 Stämme war nach 48stündiger Bebrütung bei 37 C im Röhrchentest positiv. Dagegen waren im Plattentest von 110 pathogenen Stämmen 61 (55,5 %) fibrinolysin-positiv. Alle apathogenen Stämme zeigten keine Fibrinolyse. Nach SMITH⁴⁸ waren

von 24 Staphylokokken vom Hund	24	fibrinolysin-positiv (= 100 %),
" 41 " vom Rind	8	" " (= 19,5 %),
" 23 " vom Schaf	7	" " (= 30,4 %),
" 13 " vom Geflügel	13	" " (= 100 %),
" 7 " von der Ziege	7	" " (= 100 %),
" 2 " vom Pferd	2	" " (= 100 %),

Er beobachtete dabei Klärzonen zwischen 1 bis 3 mm Durchmesser.

In einer weiteren Arbeit berichtete SMITH⁴⁹ über Untersuchungen von Staphylokokken vom Huhn. Für den Plattentest nach CHRISTIE und WILSON¹³ nahm er Rinder- und Hühnerplasma, für den Röhrchentest nach TILLET und GARNER⁵¹ Plasma vom Menschen und Schafplasma. Keine der untersuchten 15 Staph.-Kulturen vom Geflügel zeigte Fibrinolysinaktivität im Röhrchentest, sondern nur schwach positive Reaktionen im Plattentest.

In seinen Untersuchungen über Koagulase und Fibrinolysin stellte LACK³³ fest, daß Rinderplasma für den Koagulasetest nicht geeignet sei, da es den Cofaktor für Koagulase nicht in ausreichender Konzentration enthalte. Die Koagulasereaktion konnte aber nach Mischung des Rinderplasmas mit Kaninchen- oder Menschenplasma deutlich nachgewiesen werden. LACK³³ meinte, daß die meisten Plasmaarten Plasmininhibitoren besäßen, die die Fibrinolyse verhindern könnten. Diese Hemmsubstanzen würden durch Behandlung mit Chloroform unterdrückt. Von mehreren hundert Staph.-Stämmen von menschlichen Patienten waren nur etwa 10 % fibrinolytisch.

ELEK¹⁸ sah hingegen bei den meisten der koagulase-positiven Staph.-Stämme von menschlichen Infektionen Fibrinolyse. Seine Untersuchungen von Staphylokokken verschiedener Herkunft brachten folgende Ergebnisse:

Anzahl der untersuchten Staph.-Kulturen	Herkunft der Staph.-Kulturen	Fibrinolysin-positive Staph.-Kulturen
192	Oberflächliche Verletzungen beim Menschen	158 (81,2 %)
26	Menschliche Keimträger	21 (81,0 %)
58	Tierische Läsionen	22 (38,0 %)
80	Herkunft unbekannt	33 (30,0 %)

ELEK¹⁸ glaubte, daß der Plattentest von LACK³³ besonders gut für den gleichzeitigen Nachweis von Koagulase und Fibrinolysin geeignet wäre.

NETER⁴⁰ vermutete wie ELEK¹⁸ in Fibrinolysin ein wichtiges Pathogenitätsmerkmal der Staphylokokken. Nach seiner Meinung sollte die Fibrinolysininwirkung zugleich ein Unterscheidungsmerkmal für Staphylokokken verschiedener Herkunft sein.

KAFFKA²⁹ fand mit dem Plattentest von CHRISTIE und WILSON¹³ bei 274 koagulase-positiven Stämmen 267 (96,4 %) fibrinolysin-positive Staphylokokken und bei 123 koagulase-negativen Stämmen 2 (1,6 %) fibrinolysin-positive Staphylokokken.

GEORGE et al.²⁴ benutzten zum Nachweis des Fibrinolysins bei Staphylokokken vom Rind die Auflösung von Fibringerinnseeln. Von 688 Staph.-Kulturen waren 38 (5,5 %) fibrinolysin-positiv.

GRÜN²⁸ berichtete, daß Koagulase nicht mit Fibrinolysin identisch wäre. Fibrinolysin war als Antigen wirksam und konnte durch Aceton präzipitiert werden. Erhitzen auf 100 C bewirkte keine Aktivitätsminderung. Durch Zufügen von β -Toxin konnte er keine Fibrinolysehemmung beobachten. Der Röhrchentest von TILLET und GARNER⁵¹ war nach GRÜN²⁸ dem Plattentest von CHRISTIE und WILSON¹³ sowie von CHAPMAN⁹ unterlegen.

- - - -

Trotz dieser zahlreichen, bisher veröffentlichten Arbeiten, ist unser Wissen über das Fibrinolysin noch recht lückenhaft. Einige der berichteten Ergebnisse stehen sogar in direktem Widerspruch. Die folgenden Untersuchungen sollten deshalb dazu beitragen, weitere Erkenntnisse über das Fibrinolysin und seine Beziehungen zu einigen anderen Staphylokokkenfermenten und Toxinen zu gewinnen und gleichzeitig bessere Methoden zum Nachweis des Fibrinolysins zu entwickeln.

3,0 Material und Methoden

3,1 Material

3,11 Staphylokokken

Als Untersuchungsmaterial dienten insgesamt 1062 Staph.-Kulturen, davon 790 vom Rind, 250 vom Menschen und 22 vom Hund.

Tabelle I

Herkunft der Staphylokokkenkulturen

Herkunft	Mensch	Rind	Hund
Staatl. Tierärztliches Untersuchungsamt, Aulendorf	-	308	-
Bundesversuchs- u. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Inst. f. Milchhygiene, Kiel	-	482	-
Institut für Medizinische Hygiene der Universität Gießen	250	-	-
Institut für Hygiene u. Infektionskrankheiten der Tiere, Gießen	-	-	22
Gesamtzahl	250	790	22

3,12 Medien

3,121 Flüssige Medien zur Anzüchtung der Staphylokokken

Zur Züchtung der Staphylokokken wurden Brain-Heart-Infusion Broth (BHI)⁽¹⁾ und Trypticase-Soy-Broth (TSB)⁽²⁾ verwandt. Die Bouillons wurden nach den Angaben der Herstellerfirmen zubereitet und 15 Minuten bei 121 C und 1,1 atü Druck autoklaviert.

3,122 Feste Medien zur Anzüchtung der Staphylokokken

Es wurde ein Agarmedium hergestellt, das sich aus 0,1 % Pepton, 0,5 % Fleischextrakt nach LIEBIG, 0,2 % Natriumdiphosphat, 0,3 % NaCl und 2 % Agar⁽³⁾ zusammensetzte. Die Blutplatten wurden aus demselben Medium unter Zusatz von 10 % Schüttelblut vom Schaf hergestellt.

3,123 Feste Medien zum Nachweis des Fibrinolysins

3,1231 Fibrinogen-Nähragar

Zum Nachweis der Fibrinolysinbildung der Staph.-Kulturen wurden 3 g Fibrinogen (Bovine Fraction I)⁽⁴⁾ in 100 ml einer 0,87%igen Kochsalzlösung aufgelöst. Dazu wurden 3 ml Kaninchencitratplasma gegeben. Die Mischung wurde durch einen Seitz-Filter entkeimt. Die sterile Fibrinogenlösung wurde dann mit 100 ml einer Trypticase-Soy-Agarlösung vermischt, die vorher bei 121 C und 1,1 atü autoklaviert und dann auf 56 C im Wasserbad abgekühlt worden war. Die Fibrinogen-Agarlösung verblieb bis zur milchigen Trübung bei 56 C im Wasserbad. Je 10 ml des noch flüssigen Mediums wurden in vorgewärmten Petrischalen ausgegossen.

(1) Difco-Laboratories, Detroit I, Michigan, USA

(2) Baltimore Biological Laboratory, Baltimore, Maryland, USA

(3) Riedel-de Haen AG, Seelze-Hannover

(4) Armour Pharmaceutical Company, Kankakee, Illinois, USA

3,1232 Fibrinogen-Agar

Hundert ml einer 2,25%igen Fibrinogenlösung wurden durch Filtration sterilisiert und mit 100 ml einer 2%igen Agarlösung, die vorher autoklaviert worden war, im Wasserbad bei 56 C gemischt. Das Ausgießen der Platten erfolgte nach Trübung des noch flüssigen Fibrinogenagars.

3,1233 Rinderplasma-Medium

Dreißig ml Citratplasma vom Rind wurden mit 3 ml Citratplasma vom Kaninchen gemischt und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde dann mit 100 ml einer 2%igen Agarlösung im Wasserbad bei 56 C zusammengegeben und nach Einsetzen der Trübung in Petrischalen ausgegossen.

3,1234 Plattenmedium nach PULVERER⁴²

Hundert ml einer 0,5%igen Fibrinogenlösung wurden zu 500 ml einer Nutrient-Agarlösung⁽¹⁾ gegeben, die nach dem Autoklavieren im Wasserbad auf 70 C abgekühlt worden war. Die Mischung wurde bis zur Trübung bei dieser Temperatur im Wasserbad belassen.

3,1235 Kaninchenplasma-Medium

Zwanzig ml filtriertes Kaninchenplasma wurden mit 100 ml einer 2%igen Agarlösung bei 56 C gemischt. Nach Einsetzen der Trübung erfolgte das Ausgießen in Platten.

3,1236 Fibrinogen-Koagulase-Medium

Hundert ml einer 3%igen Fibrinogenlösung, 3 ml Citratplasma von Kaninchen und 5 ml Koagulaselösung wurden gemischt und filtriert. Die Koagulaselösung enthielt 320 Koagulaseeinheiten pro ml (BLOBEL et al.⁶). Diese Koagulase-Fibrinogenlösung wurde mit 100 ml einer 2%igen Agarlösung bei 50 C im Wasserbad gemischt und

(1) Difco-Laboratories, Detroit I, Michigan, USA

ohne Verzug ausgegossen. Das Medium wies nach einer 8 bis 10stündigen Aufbewahrung bei 4 C eine starke Trübung auf.

3,2 Methoden

3,21 Fibrinolysinnachweis

3,211 Fibrinolysinnachweis auf festen Medien

Nach 24stündiger Bebrütung der Staph.-Kulturen auf Nähragarmedien oder Blutplatten wurden die Staph.-Stämme auf den schon beschriebenen Medien ausgestrichen und dann 24 Stunden bei 37 C bebrütet. Auf einer Platte konnten so gleichzeitig 8 bis 10 Kulturen untersucht werden (Abb. 1). Die Bouillonkulturen wurden nach 24stündiger Bebrütung bei 37 C in einer SORVALL-SS 4-Zentrifuge⁽¹⁾ bei 16300 x g 30 Minuten zentrifugiert und anschließend durch Seitz- oder Milliporefilter⁽²⁾ (0,65 u durchschnittliche Porengröße) entkeimt. Die Fibrinolysinaktivität der Zentrifugate und Filtrate wurde auf dem beschriebenen Fibrinogenagar in kleinen Metallzylindern geprüft, die in der Werkstatt des Institutes hergestellt worden waren. Die Zylinder bestanden aus 58 % Kupfer und 42 % Zink. Sie waren 0,9 cm hoch und hatten einen inneren Durchmesser von 0,6 cm bei einem äußeren Durchmesser von 0,7 cm. Die Metallzylinder wurden durch Eintauchen in Alkohol und anschließendem Abflammen sterilisiert und noch warm auf den Fibrinogenagar gebracht. Hierdurch sanken die Zylinder leicht in das Medium. Die in die Zylinder verbrachte Testflüssigkeit diffundierte, ohne auf der Oberfläche des Mediums auszulaufen, in den Agar (Abb. 2).

(1) Sorvall-Wissenschaftliche Apparate, Heidelberg - Wiesbaden

(2) Millipore-Filter, Typ DA, Fa. Ing. A. Hofmann, Bamberg

3,212 Fibrinolysinnachweis in flüssigen Medien

Zur Prüfung der Fibrinolysinaktivität von Staphylokokken wurden neben den festen Medien folgende Indikator-Suspensionen verwandt:

3,2121 Fibrinogen-Plasma-Lösung

Eine 1,5%ige Fibrinogen-Plasma-Lösung wurde nach der Methode von DENEKE und BLOBEL¹⁵ hergestellt und mit Staph.-Kulturmateriel beimpft.

3,2122 Kaninchencitratplasma-Lösung

Es wurden 0,2 ml Citratplasma von Kaninchen mit 0,8 ml physiol. NaCl und 0,25 ml CaCl_2 in Agglutinationsröhrchen gemischt. In diese Mischung wurde eine Öse voll Staph.-Kultur gegeben (TILLET u. GARNER⁵¹).

3,22 Quantitative Bestimmung des Fibrinolysins

3,221 Fibrinogen-Plasma-Koagulaselösung

Diese Lösung eignete sich am besten zum quantitativen Nachweis des Fibrinolysins. Es wurden 4 Teile einer 3%igen Fibrinogenlösung, der Kaninchenplasma bis zu einer Endkonzentration von 2 % zugefügt worden war, und 1 Teil einer Koagulaselösung, die 320 Koagulaseeinheiten pro ml enthielt, gemischt. Zu 0,25 ml dieser Mischung wurden 0,25 ml der zu untersuchenden Fibrinolysinlösung gegeben.

3,23 Koagulasenachweis und Anreicherung

3,231 Nachweismethoden von Koagulase

Die Untersuchung der Staphylokokken auf ihre Koagulaseaktivität erfolgte mit dem Röhrchen-, dem Objektträger- und dem Plattentest.

3,2311 Koagulaseprüfung im Röhrchentest

Der Röhrchentest wurde in Anlehnung an die Arbeiten von TILLET und GARNER⁵¹, ROEMER und SCHMITZ⁴⁴, BERGER³, DUTHIE und LORENZ¹⁶, FISHER²¹ sowie DENEKE und BLOBEL¹⁵ wie folgt ausgeführt: 0,25 ml Citratplasma vom Kaninchen oder vom Schaf wurden mit 0,25 ml physiol. NaCl verdünnt und mit einer Öse voll Staph.-Material beimpft. Die Röhrchen wurden 24 Stunden bei 37 C bebrütet. Die Reaktionen wurden nach 3,8 und 24 Stunden abgelesen.

3,2312 Koagulaseprüfung im Objektträgertest

Es wurde eine Methode gewählt, die sich im wesentlichen nach den Angaben von WILLIAMS und HARPER⁵³ richtete. Eine Öse mit Staph.-Kultur wurde in einem Tropfen 0,87%iger Kochsalzlösung gleichmäßig verrieben. Ein Teil dieser Suspension wurde anschließend in einem Tropfen Citratplasma von Kaninchen eingerieben, der andere Teil diente als Kontrolle. Als koagulase-positiv galten nur solche Staphylokokken, bei denen das Plasma innerhalb 10 Sekunden verklumpte.

3,2313 Koagulasenachweis im Fibrinogenagar

Die Zusammensetzung des Mediums war mit der des Fibrinogenagars identisch. Die Mischung des Fibrinogens mit dem Agar erfolgte jedoch im Wasserbad bei 48 C. Die Fibrinogenagarlösung wurde unverzüglich in Petrischalen ausgegossen.

3,232 Darstellung von Koagulase und ihre quantitative Bestimmung

Die Anreicherung der Koagulase erfolgte nach den Angaben von BLOBEL et al.⁶. Es wurde ein stark koagulase-positiver Staph.-Stamm vom Rind zur Untersuchung be-

nutzt. Nach 3tägiger Bebrütung der Bouillonkultur bei 37 C wurde durch fortlaufende Zentrifugation⁽¹⁾ der Überstand gewonnen. Er wurde mit 4 n HCl auf einen pH-Wert von 3,8 gebracht. Das sich bildende Präzipitat wurde durch Zentrifugation gewonnen und in destilliertem Wasser aufgelöst. Von dieser Lösung wurde Koagulase mit Alkohol (Endkonzentration 70 %) nochmals ausgefällt und anschließend, nach der Dialyse gegen destilliertes Wasser, lyophilisiert. Die quantitative Bestimmung der Koagulase wurde in der schon beschriebenen Fibrinogen-Plasma-Koagulasensuspension vorgenommen. Die Berechnung der Minimal Clotting Dosis erfolgte nach den Angaben von BLOBEL et al.⁶. Der Proteingehalt wurde durch die FOLIN-Reaktion bestimmt (LOWRY et al.³⁵).

3,24 Nachweis der Mannitvergärung durch Staphylokokken

Die Vergärung von Mannit wurde auf einem Mannit-Bromthymolblau-Agar geprüft. Die Säurebildung bei der Mannitspaltung wurde durch Gelbfärbung des Bromthymolblau-Indikators sichtbar.

3,25 Hämolysinnachweis

Die Staphylokokken wurden auf Schafblutagar ausgestrichen. Nach 20stündiger Bebrütung bei 37 C wurde die Hämolysinbildung abgelesen. Eine weitere Ablesung erfolgte dann nach 4stündiger Aufbewahrung der Platten bei 4 C.

3,26 Versuch der Antikörperstimulierung durch Fibrinolysin

Für die Antikörperstimulierung wurde ein stark fibrinolytin-positiver Staph.-Stamm vom Rind ausgewählt, der keine Koagulaseaktivität und keine Hämolysinbildung zeigte. Das Fibrinolysin wurde durch Ammoniumsulfat-

(1) Sorvall-SS 4-Zentrifuge mit Ansatz für "continuous flow"

fraktionierung angereichert (siehe Abschnitt 4,6). Ein ml dieser Fibrinolysinlösung, der bei einem Proteingehalt von 12,2 mg (nach Folin) 1024 Fibrinolysineinheiten enthielt, wurde mit 1 ml "Algivant"⁽²⁾ (4 % Natrium-Alginat-Adjuvans mit 0,67 % Calciumgluconat) gemischt. Je 2 ml dieser Mischung wurden 2 Kaninchen mit einem Gewicht von 2,5 kg subkutan an 2 verschiedenen Stellen eingespritzt. Die Injektionen wurden im Abstand von 8 Tagen wiederholt. Fünf Wochen nach der ersten Impfung wurde das Serum der Kaninchen auf Antikörper untersucht.

(2) Colab Laboratories, Inc., Chicago Heights, Illinois, USA

4,0 Ergebnisse

4,1 Wahl eines geeigneten Mediums zum Fibrinolysin-Nachweis

Es wurden 6 verschiedene Agar-Medien auf ihre Eignung für den Fibrinolysinnachweis geprüft. Bei der Herstellung der Medien wurde besonders darauf geachtet, daß Plasma und Fibrinogen nicht über 56 C erhitzt wurden. Damit sollte die flockige Ausfällung des Fibrinogens verhindert werden, welche die Platten für die Fibrinolysinuntersuchungen unbrauchbar gemacht hätte. Zum Nachweis des Fibrinolysins eignete sich am besten der Fibrinogenagar, auf dem es zu deutlichen Aufhellungszonen kam. Für die Erkennung schwach fibrinolysin-positiver Staphylokokken war das Rinderplasma-medium gut geeignet. Seine Herstellung war aber sehr schwierig, da es leicht zur Ausfällung des Rinderplasmas kam. Kaninchenplasmamedien wiesen bei den verwandten Plasamengen keine ausreichende Trübung auf. Für die vorläufige quantitative Bestimmung des Fibrinolysins war das Fibrinogen-Koagulasemedium gut geeignet, da der Koagulasegehalt des Mediums und damit indirekt seine Trübung optimal eingestellt werden konnte (Abb. 3).

4,2 Quantitative Bestimmung des Fibrinolysins

In der Literatur konnten nur wenige Angaben über quantitative Fibrinolysinbestimmungen gefunden werden (TILLET u. GARNER⁵¹, KLINE³¹). TILLET und GARNER⁵¹ benutzten zur quantitativen Fibrinolysinbestimmung einen Röhrchentest. Das Plasma wurde durch CaCl_2 zur Koagulation gebracht, nachdem es vorher mit verschiedenen Fibrinolysinverdünnungen gemischt worden war. Die Auflösung der Koagula zeigte die Fibrinolysinaktivität an. Dieser Test reichte aber zur quantitativen Bestimmung nicht aus, da die Grenzen der Fibrinolysinwirkung oft unklar waren, und somit keine eindeutigen Endwerte abgelesen werden konnten. Außerdem bestand bei der Verwendung reinen Plasmas immer die Möglichkeit, daß darin Antikörper gegen Fibrinolysin vorhanden

waren, die die Fibrinolyse-Reaktionen hätten beeinflussen können. Das Vorhandensein von Antikörpern gegen Fibrinolysin konnte KLINE³¹ durch die Benutzung gereinigten Rinderfibrinogens anstelle von Plasma ausschließen. Das Fibrinogen wurde durch eine bekannte Menge Thrombin in Fibrin umgewandelt. Die Fibrinolysineinheiten bestimmte er nach der Geschwindigkeit der Fibrinauflösung.

Bei der in dieser Arbeit benutzten Methode wurde ebenfalls gereinigtes Rinderfibrinogen verwandt, dem noch 2 % Kaninchenplasma als Cofaktor zugesetzt worden war. Das Fibrinogen wurde nicht durch Thrombin, sondern durch eine bestimmte Menge Koagulase (M.C.D.)⁽¹⁾ in Fibrin umgewandelt. Die Koagulase war nach der schon beschriebenen Methode angereichert worden (LOBEL et al.⁶).

Die Fibrinolysinbestimmungen wurden in 2fachen Verdünnungsreihen durchgeführt. Nachdem die zu prüfende Fibrinolysinlösung in physiolog. NaCl zweifach verdünnt worden war, wurden zu je 0,25 ml dieser Verdünnungen 0,1 ml einer Koagulaselösung mit 1 M.C.D. und 0,4 ml einer Fibrinogen-Plasma-Lösung in Agglutinationsröhrchen gemischt. Die Fibrinogenlösung bestand aus 3 % Fibrinogen und Kaninchenplasma in einer Endkonzentration von 2 %. Die Testlösungen wurden 3 Stunden bei 37 C bebrütet und dann abgelesen. Die Röhrchen, in denen das Fibrinolysin noch wirksam war, hatten nach dieser Bebrütungszeit einen flüssigen Inhalt. Die anderen Röhrchen zeigten feste Koagula durch Koagulase (Abb. 4). Alle Untersuchungen wurden in einer doppelten Versuchsanordnung ausgeführt. Blieben zum Beispiel die Suspensionen bis zu einer Fibrinolysinverdünnung von 1 : 100 flüssig, so waren in 0,25 ml Fibrinolysinlösung 100 Fibrinolysineinheiten (F.E.) enthalten; das entsprach 400 F.E. pro ml.

(1) M.C.D. = Minimal Clotting Dosis

4,3 Häufigkeit der Fibrinolysinbildung bei Staphylokokken verschiedener Herkunft

4,31 Fibrinolysin-positive Staphylokokken bei Rind, Mensch und Hund

Die Untersuchung der Staph.-Kulturen vom Rind, Mensch und Hund auf Fibrinolysinbildung erfolgte auf dem Fibrinogen-Nähragar-Medium. Von 790 untersuchten Staph.-Kulturen vom Rind waren 42 (5,3 %) fibrinolysin-positiv, von 250 vom Menschen 40 (16 %) und von 22 vom Hund 11 (50 %). Daraus ging hervor, daß der geringste Anteil fibrinolysin-positiver Staphylokokken beim Rind zu finden war. Auffallend war der hohe Prozentsatz der fibrinolysin-positiven Staphylokokken beim Hund. Der relative Anteil fibrinolysin-positiver Staphylokokken vom Menschen lag zwar über dem fibrinolysin-positiver Staphylokokken vom Rind, war aber bedeutend geringer als aus vorher veröffentlichten Daten entnommen werden konnte (AOI², CHAPMAN⁹, ELEK¹⁸, KAFFKA²⁹). Hierbei mußte jedoch berücksichtigt werden, daß von diesen 250 untersuchten Staph.-Kulturen vom Menschen nur 58 koagulase- und mannit-positiv waren, und damit als Staph. aureus definiert werden konnten (BREED et al.⁷, MEYER³⁸). Von diesen 58 Staph. aureus-Kulturen waren 24 (41,4 %) fibrinolysin-positiv. Auch dieser prozentuale Anteil war geringer als vorher von anderen Autoren angegeben worden war.

4,32 Fibrinolysinverteilung bei Staphylokokken von verschiedenen Infektionsherden des Menschen

Um die Unterschiede in der Anzahl fibrinolysin-positiver Staphylokokken vom Menschen weiter zu analysieren, wurde im einzelnen die Herkunft der Staph. aureus-Kulturen ermittelt. Dabei wurde festgestellt, wieviel

Kulturen von "oberflächlichen" und wieviel von "tiefen" Infektionen stammten. Einundzwanzig (87,5 %) der 24 fibrinolysin-positiven Staphylokokken wurden von inneren Erkrankungsherden isoliert. Diese Beobachtungen stimmten weitgehend mit denen von MADISON und DART³⁶ überein, die ebenfalls den größten Teil der fibrinolysin-positiven Staphylokokken in inneren Erkrankungsherden fanden. Bei den Staphylokokken vom Rind waren entsprechende Vergleiche nicht möglich, da alle Staphylokokken-Kulturen aus Milchproben stammten. Die Staphylokokken vom Hund wurden ausnahmslos aus Eiterprozessen isoliert.

4,4 Einige Merkmale fibrinolysin-positiver Staphylokokken

Alle untersuchten Merkmale von fibrinolysin-positiven Staph.-Kulturen wurden in der Abbildung 5 dargestellt.

Dabei ist schon bei der ersten Betrachtung dieser Daten auffällig, daß die Anzahl der koagulase-positiven Staphylokokken im Objektträgertest wesentlich höher war als im Röhrchentest.

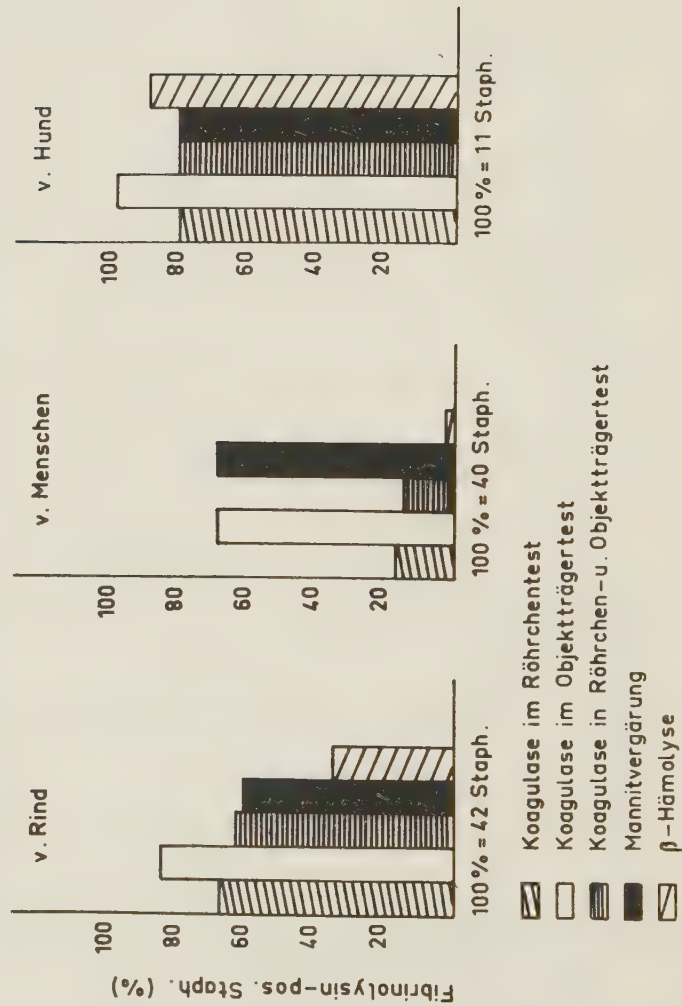
Die Beziehungen der einzelnen Merkmale sollen in den folgenden Abschnitten aufgezeigt werden.

4,41 Koagulase und Mannitvergärung

Die fibrinolysin-positiven Staphylokokken wurden auf Koagulaseaktivität und Mannitvergärung untersucht, da beide Merkmale für die Gattungsdiagnose "Staph. aureus" von Bedeutung sind. Von 42 Staph.-Kulturen vom Rind waren 16 (38,1 %) mannit-negativ. Diese Staph.-Kulturen würden nach der Definition in "BERGEY'S MANUAL"⁽¹⁾ nicht zur Gattung Staph. aureus gehören. Da neben der Mannitvergärung für Staph. aureus auch die Koagulaseaktivität erforderlich ist, wurden sämtliche mannit-positiven Staphylokokken im Röhrchentest auf Koagulase

(1) Bergey's manual of determinative bacteriology⁷

Abb. 5 Koagulasebildung, Mannitvergärung und β -Hämolysen bei fibrinolyse-positiven Staphylokokken



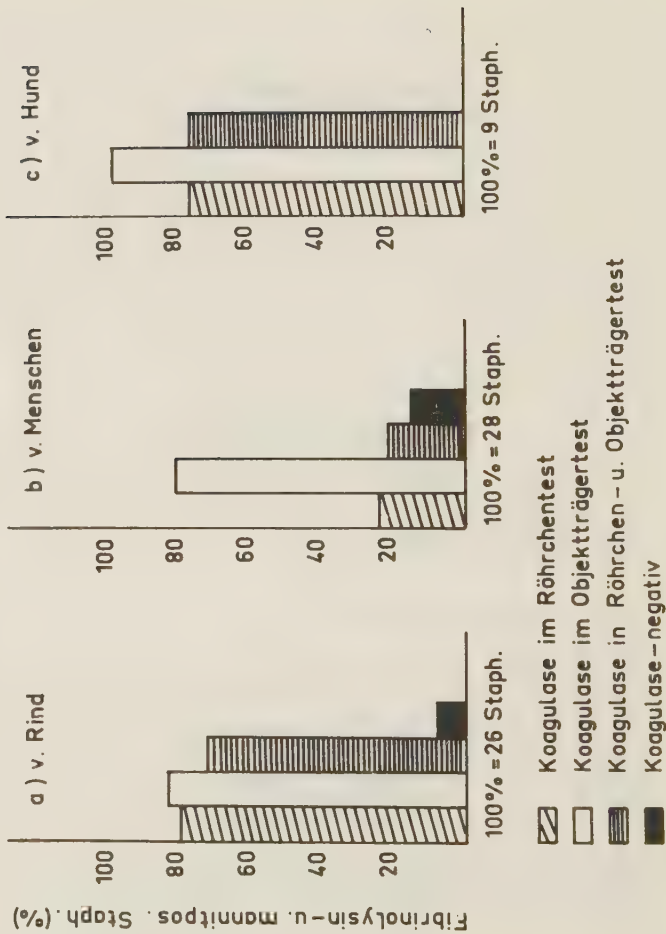
untersucht. Von 28 mannit-positiven Staphylokokken vom Menschen zeigten im Röhrchentest nur 7 (25 %) Koagulase-aktivität, beim Rind waren es von 26 mannit-positiven Staphylokokken 21 (80,8 %) und beim Hund von 9 mannit-positiven Staphylokokken 7 (77,7 %). Diese auffallenden Unterschiede zwischen Mannitvergärung und Koagulasebildung im Röhrchentest ließen den Verdacht aufkommen, daß es sich bei den Kulturen um Staph. aureus handeln könnte. Es bestand die Möglichkeit, daß Fibrinolysin die Koagulasereaktion verhinderte. Deshalb wurden sämtliche mannit-positiven Staphylokokken zusätzlich mit der Objektträgerprobe untersucht, da es durch Koagulasewirkung zur augenblicklichen Verklumpung des Plasmas kommt. Das Fibrinolysin konnte in diesem kurzen Zeitraum die Koagulasereaktion nicht beeinflussen.

Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, daß der Anteil koagulase-positiver Staphylokokken in der Objektträgerprobe besonders bei den Kulturen vom Menschen bedeutend höher war (Abb. 6).

4,42 Fibrinolysin und Koagulase

Fibrinolysin und Koagulase waren ursprünglich als eine Substanz angesehen worden (KLEINSCHMIDT³⁰, GRATIA²⁷). Diese Annahme konnte durch eigene Versuchsergebnisse widerlegt werden (Abb. 5). Es wurden viele Staphylokokken gefunden, die entweder nur das eine oder das andere Ferment bildeten. Fibrinolysinaktivität bei koagulase-negativen Staph.-Kulturen war bisher nur von wenigen Autoren beobachtet worden. So fanden CHRISTIE und WILSON¹³ unter 97 fibrinolysin-positiven Staph.-Kulturen nur eine koagulase-negative, und KAFFKA²⁹ unter 123 koagulase-negativen Staph.-Kulturen nur 2 fibrinolysin-positive. SMITH⁴⁸ konnte bei seinen Untersuchungen koagulase-negativer Staphylokokken überhaupt keine Fibrinolysinaktivität nachweisen.

Abb. 6 Koagulasebildung bei fibrinolysin-positiven
u. mannitvergärenden Staphylokokken



Das gleichzeitige Vorkommen beider Fermente konnte, wie schon erwähnt, gelegentlich dazu führen, daß das Fibrinolysin die Koagulasereaktion verhinderte. Diese Erscheinung trat bereits in den unterschiedlichen Ergebnissen von Röhrchen- und Objektträgertests zutage. Die Verschleierung der Koagulasewirkung durch Fibrinolysin konnte weiterhin durch einen Verdünnungsversuch nachgewiesen werden. Dabei wurden mehrere, stark fibrinolysin-positive Staph. aureus-Bouillonkulturen nach 24stündiger Bebrütung bei 37 C zentrifugiert. Von den Überständen wurden 2fache Verdünnungsreihen angelegt. Jeweils 0,25 ml der einzelnen Verdünnungen wurden mit 0,4 ml einer Fibrinogen-Plasmalösung gemischt und bei 37 C bebrütet. Bei den niedrigeren Verdünnungen blieb im allgemeinen nach der 3stündigen Bebrütung die Fibrinolysin-Plasmalösung flüssig, wohingegen sie bei den weiteren Verdünnungen durch die Koagulasewirkung koaguliert wurde. In den ersten Röhrchen war die Koagulasereaktion offensichtlich durch das Fibrinolysin verhindert worden. Die relative Koagulaseaktivität war in der Regel stärker als die Fibrinolysinswirkung.

4,43 Fibrinolysin und Hämolysin

Bei der Untersuchung fibrinolysin-positiver Staphylokokken auf Hämolysinbildung wurde besonderer Wert auf den Nachweis des β -Hämolysins gelegt, da bei Staphylokokken mit β -Hämolysinbildung in der Regel keine Fibrinolysinaktivität vorkommen sollte (CHRISTIE u. WILSON¹³, ROUNTREE⁴⁵). Die Untersuchungen fibrinolysin-positiver Staphylokokken vom Menschen bestätigten diese Angaben. Nur 1 von 40 fibrinolysin-positiven Staph.-Kulturen war β -hämolytisch. Auf der anderen Seite waren die entsprechenden Prozentzahlen bei Staphylokokken vom Rind und Hund bedeutend höher. Von 42 Kulturen vom Rind waren 15 (35,7 %) und von 11 Kulturen vom Hund sogar 10 (90,9 %) β -hämolytisch. Hieraus geht her-

vor, daß Fibrinolysinaktivität und β -Hämolyse, zumindest bei Staphylokokken vom Rind und Hund, häufig gemeinsam anzutreffen sind. Die Annahme von CHRISTIE und WILSON¹³ und ROUNTREE⁴⁵, wonach Fibrinolysin und β -Hämolysin sich gegenseitig ausschließen würden, träfe also nur für die Staph.-Kulturen vom Menschen zu, bei denen die β -Hämolysinbildung ohnehin selten ist.

4,5 Produktion von Fibrinolysin

Zur Feststellung der für den Fibrinolysinnachweis erforderlichen Diffusionszeit wurden gleichzeitig mehrere Bouillonkulturen in Metallzylinder gegeben und 24 Stunden bei 37 C bebrütet. Dabei wurde die Diffusion des Fibrinolysins in das Medium stündlich gemessen (Abb. 7). Die stärkste Zunahme der Aufhellungsdurchmesser um die Zylinder war nach einer Bebrütung von 3 bis 8 Stunden zu verzeichnen. Bei den meisten Staph.-Kulturen war eine deutliche Fibrinolyse bereits nach 8 bis 10 Stunden bei 37 C festzustellen. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu früheren veröffentlichten Angaben, wonach eine 48stündige Diffusionszeit für den Nachweis des Fibrinolysins nötig sei (SMITH⁴⁸). In einem weiteren Versuch wurde die Fibrinolysinaktivität der Staph.-Kulturen während einer 14tägigen Bebrütung geprüft. Es wurden Zentrifugate und Filtrate von Staph.-Bouillonkulturen, die auf einer Rundschüttelmaschine⁽¹⁾ bei 37 C bebrütet worden waren, täglich auf ihren Fibrinolysingehalt untersucht. Dabei wurden deutliche Aktivitätsunterschiede innerhalb der einzelnen Bebrütungszeiträume festgestellt (Abb. 8 und 9).

Auffallend war ein vollständiger Abfall der Fibrinolysinaktivität für die Dauer von 3 Tagen, der nach einer 3 bis 4tägigen Bebrütung der Kulturen auftrat. Diese Beobachtungen wurden bei allen untersuchten Staph.-Kulturen gemacht. Die größte Fibrinolysinaktivität war nach einer

(1) Rundschüttelmaschine, Modell RC 4 der Fa. A. Kühner, Basel

Abb. 7

Diffusion von Fibrinolytin in Fibrinogenagar bei 37 C

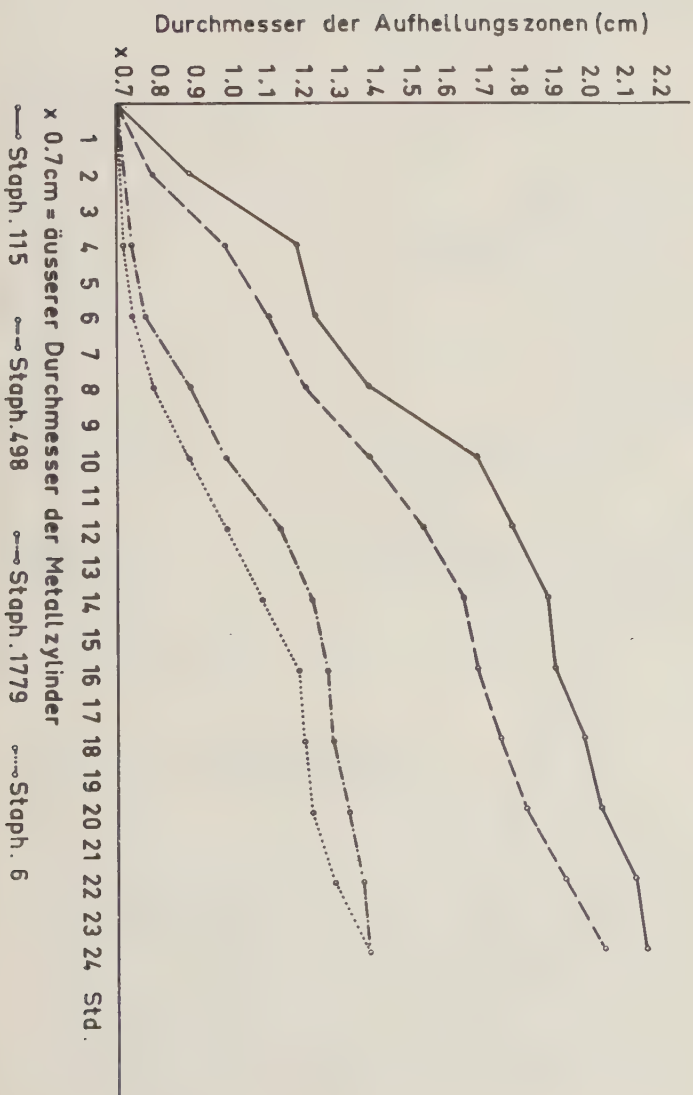
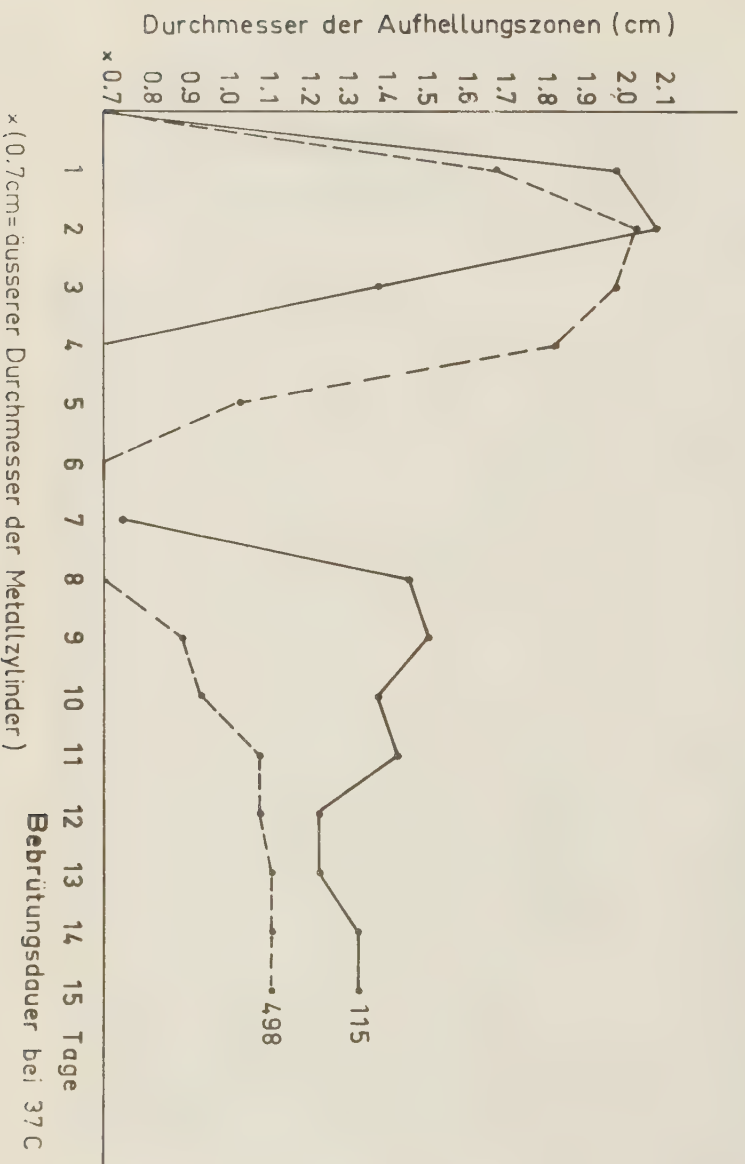


Abb. 8 Fibrinolytaktivität zweier Staph.-Kulturen (115 u. 498) während einer 15 tägigen Bebrütung bei 37 C



2tägigen Bebrütung vorhanden. Der Fibrinolysinnachweis bei Staph.-Kulturen erfolgte deswegen nach 2tägiger Bebrütung bei 37 C.

Da von mehreren Autoren (GENGOU²³, AOI², FISHER²⁰) sich widersprechende Angaben über die Fibrinolysinaktivität von Zentrifugaten und Filtraten gemacht worden waren, sollte mit Hilfe der Metallzylinder festgestellt werden, ob irgendwelche Unterschiede in der Aktivität nachweisbar waren. Die Bouillonkulturen wurden nach 24stündiger Bebrütung 30 Minuten bei 16300 x g zentrifugiert. Die Zentrifugate wurden zum Teil direkt untersucht oder nach anschließender Filtration auf ihre Fibrinolysinaktivität geprüft. Zur Filtration wurden Millipore- und Seitzfilter verwandt. Die Aufhellungszonen der Filtrate und Zentrifugate wurden jeweils nach 21- und 55stündiger Bebrütung gemessen und miteinander verglichen. Aus diesen Untersuchungen ging hervor (Tabelle II), daß zwischen der Fibrinolysinaktivität von Zentrifugaten und Filtraten keine wesentlichen Unterschiede bestanden. Beide Präparationen waren somit gleichermaßen für die weiteren Fibrinolysinverseuche geeignet. Die Beobachtungen von AOI², nach welchen ein großer Teil des Fibrinolysins von Berkefeld- und Seitzfiltern absorbiert worden war, konnten im Falle der Seitz- und Milliporefilter nicht bestätigt werden.

4,6 Anreicherung des Fibrinolysins

Für die Fibrinolysinanreicherung wurde ein Staph.-Stamm ausgesucht, der stark fibrinolysin-positiv war und bei dem keine Koagulasebildung nachweisbar war. Die Bouillonkultur wurde 2 Tage bei 37 C auf der Rundschüttelmaschine bebrütet und dann bei 16300 x g zentrifugiert. Eine Anreicherung wurde durch verschiedene Methoden versucht. Die Fibrinolysinausfällung mit Trichloressigsäure nach PILLET et al.⁴¹, sowie mit Alkohol oder Aceton nach AOI² und FISHER²⁰, führte zu keiner wesentlichen Anreicherung des Fibrinolysins.

Tabelle II

Prüfung von Staph.-Bouillonkultur-Zentrifugaten
und -Filtraten auf Unterschiede in der Fibrino-
lysinaktivität +

Staph.- Kulturen Nr.	21 Stunden bei 37 C			55 Stunden bei 37 C		
	Zentri- fugate	Filtra- te	Diffe- renzen	Zentri- fugate	Filtra- te	Diffe- renzen
99	1,15 cm	1,15 cm	- cm	1,35 cm	1,4 cm	0,05 cm
394	1,63 cm	1,65 cm	0,02 cm	2,32 cm	2,4 cm	0,08 cm
396	1,77 cm	1,7 cm	0,07 cm	2,68 cm	2,65 cm	0,03 cm
425	1,75 cm	1,7 cm	0,05 cm	2,18 cm	2,17 cm	0,01 cm
418	1,5 cm	1,5 cm	- cm	1,8 cm	1,73 cm	0,07 cm
532	1,16 cm	1,15 cm	0,01 cm	1,23 cm	1,2 cm	0,03 cm
552	1,95 cm	2,0 cm	0,05 cm	2,45 cm	2,5 cm	0,05 cm
455/186	1,0 cm	1,0 cm	- cm	1,23 cm	1,15 cm	0,08 cm
455/165	1,9 cm	1,85 cm	0,05 cm	2,45 cm	2,5 cm	0,05 cm
464/69	0,9 cm	0,9 cm	- cm	1,2 cm	1,3 cm	0,1 cm

+ Die angegebenen Werte sind die Durchmesser der Aufhellungszonen auf dem Fibrinogenagar

Dagegen gelang die Anreicherung von Fibrinolysin durch Ammoniumsulfatfraktionierung. Bei 4 C wurde dem Bouillonkultur-Zentrifugat auf einem Magnetprüher Ammoniumsulfat bis zur Sättigung zugegeben. Nach 12 Stunden bei 4 C wurde das Präzipitat abzentrifugiert und in destilliertem Wasser aufgelöst. Das Volumen des destillierten Wassers betrug etwa 1/100 des Bouillonkultur-Zentrifugates. Durch anschließende Dialyse gegen Leitungswasser und dest. Wasser wurden die Ammoniumsulfatreste ausgewaschen.

Das Bouillonkultur-Zentrifugat und das angereicherte Fibrinolysin wurden dann mit der schon beschriebenen quantitativen Methode auf ihren Fibrinolysegehalt untersucht. Hierzu wurden je 0,25 ml der zu prüfenden Lösungen 2fach verdünnt. Die Verdünnungen wurden dann mit der Fibrinogen-Koagulaselösung gemischt und bei 37 C bebrütet. Nach 3 Stunden wurden die Resultate abgelesen. Dabei zeigte das Bouillonkultur-Zentrifugat eine Fibrinolyse bis zu einer Verdünnung von 1 : 4, das angereicherte Fibrinolysin dagegen bis zu einer Verdünnung von 1 : 256.

Der Proteingehalt der Bouillonkultur-Zentrifugate betrug 11,3 mg pro ml, der des angereicherten Fibrinolysins 12,2 mg pro ml. Demzufolge enthielt das Bouillonkultur-Zentrifugat 1,42 Fibrinolysineinheiten pro mg Protein und das angereicherte Fibrinolysin 83,9 Fibrinolysineinheiten pro mg Protein. Durch die Ammoniumsulfatfraktionierung wurde somit eine nahezu 60fache Anreicherung des Fibrinolysins erzielt.

4,7 Temperaturempfindlichkeit des Fibrinolysins

Von mehreren Autoren (GERHEIM et al.²⁵, AOI², CHRISTIE et al.¹¹, PILLET et al.⁴¹) waren unterschiedliche Angaben über die Temperaturempfindlichkeit von Fibrinolysin gemacht worden. Um diese Unterschiede zu klären, wurden die Bouillonkultur-Zentrifugate und -Filtrate von 2 fibrino-

lysin-positiven Staph.-Kulturen im Wasserbad bei verschiedenen Temperaturen erhitzt. Eine Erhitzung der Fibrinolysinlösungen bis 56 C für 15 Minuten hatte keinen Einfluß auf die Fibrinolysinaktivität. Bei Erhitzung der Lösungen über 56 C für 15 Minuten wurde die Fibrinolysininwirkung jedoch so stark abgeschwächt, daß sie nicht mehr auf dem Fibrinogenmedium nachzuweisen war. Die einzelnen Ergebnisse, nach einer Erhitzungszeit von je 15 Minuten bei verschiedenen Temperaturen, sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. Die Fibrinolysinaktivität ist durch das Plus-Zeichen gekennzeichnet.

Staph.-Kultur	45C	50C	56C	65C	75C	85C	100 C
115	+	+	+	-	-	-	-
498	+	+	+	-	-	-	-

4,8 Antikörperstimulierung durch Fibrinolysin

Zum Nachweis der Antikörperbildung gegen Fibrinolysin bei Kaninchen wurden verschiedene Methoden angewandt. Im "Filterpapier-Diffusionstest" von ELEK¹⁸ sollte die Hemmung der Fibrinolysewirkung von Staph.-Kulturen auf Fibrinogenmedium nachgewiesen werden. Hierzu wurde eine Staph.-Kultur auf dem Agar ausgestrichen und senkrecht dazu ein Filterstreifen aufgebracht, der mit Antiserum oder dem jeweiligen "Normalserum" (vor der Fibrinolysininjektion gewonnen) oder anderen Seren unbehandelter junger Kaninchen getränkt worden war.

Nach 24stündiger Bebrütung bei 37 C konnte zwar zwischen Antiserum und Staph.-Kultur eine Hemmung der Aufhellungszone festgestellt werden, jedoch waren auch zwischen den anderen Kontrollseren und der Staph.-Kultur ähnliche Hemm-

zonen nachweisbar. Ein deutlicher Unterschied dieser Zonen war dabei nicht festzustellen. In einem weiteren Versuch wurden Metallzylinder auf Fibrinogenagar mit dem Antiserum, den Kontrollseren und physiologischer Kochsalzlösung gefüllt. In gleichem Abstand (0,4 cm) wurden weitere Metallzylinder mit angereicherter Fibrinolysinlösung aufgebracht. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37 C konnte eine deutliche Hemmung der Fibrinolysinwirkung durch das Antiserum, aber auch durch die Kontrollseren, festgestellt werden. Eine solche Hemmung wurde durch die Kochsalzlösung nicht hervorgerufen. Zwischen dem Antiserum und dem angereicherten Fibrinolysin bildeten sich Präzipitationslinien (Abb. 10). Das Auftreten dieser Präzipitationslinien ließ auf die Bildung präzipitierender Antikörper schließen. Um die entsprechenden Antigene und Antikörper weiter zu analysieren, wurde zunächst der Ouchterlony-Test hinzugezogen. Hierbei wurde die LKB-Immunoelktrophoreseausrüstung⁽¹⁾ benutzt. Wie erwartet ergab auch dieser Test zwischen Antigen und Antiserum starke Präzipitationslinien, die zwischen dem Antigen und den Kontrollseren fehlten (Abb. 11).

Zur weiteren Kontrolle dieser Versuche wurde die Staph.-Bouillonkultur eines fibrinolysin-negativen Staphylokokken-Stammes verwandt, die wie zur Fibrinolysinanreicherung behandelt worden war. Zwischen dieser Kontrolllösung und dem Antiserum traten keine Präzipitationslinien auf.

Zur Analysierung der Präzipitate wurde eine elektrophoretische Trennung der angereicherten Fibrinolysinlösung und eine anschließende Immunodiffusion durchgeführt. Dabei traten 11 verschiedene Präzipitationslinien auf (Abb. 12). Welche dieser Linien, wenn überhaupt, der Fibrinolysin-Antifibrinolysin-Reaktion entsprechen, muß noch durch weitere Untersuchungen, möglicherweise durch Überschichtung des Immunoelktrophorogramms mit Fibrinogenmedium, ermittelt werden.

(1) LKB-Produktor AB, Stockholm 12, Schweden

5,0 Diskussion

Fibrinolysin wurde ursprünglich nur bei Staph.-Kulturen vom Menschen gefunden und immer in Verbindung mit Koagulase. Da Fibrinolysin zunächst bei koagulase-positiven Staphylokokken gefunden worden war, glaubten viele Autoren, daß beide Fermente an die gleiche Substanz gebunden seien. Diese Annahme wurde von KLEINSCHMIDT³⁰, GRATIA²⁷ und GENGOU²³ verfochten. GRATIA²⁷ und GENGOU²³ sahen in der Fibrinolysinswirkung nur den 2. Schritt einer Reaktion, die mit der Koagulation des Plasmas begann und mit der Auflösung des Koagulums endete. Diese "Einheitshypothese" wurde aber schnell fallengelassen, da man viele Staph.-Kulturen ermittelte, die koagulase-positiv waren, bei denen aber kein Fibrinolysin nachzuweisen war. Außerdem wurden, wenn auch nur sehr selten, Staphylokokken gefunden, bei denen zwar Fibrinolysin, aber keine Koagulase vorkam (CHRISTIE u. WILSON¹³, KAFFKA²⁹, SMITH⁴⁸). Bei diesen Untersuchungen wurde dagegen eine ganze Reihe von Staph.-Kulturen geprüft, die fibrinolysin-positiv und koagulase-negativ waren. Bei den Staphylokokken vom Rind waren es 9,5 % der fibrinolysin-positiven Stämme und bei den Staphylokokken vom Menschen sogar 27,5 %.

Über die Verteilung von Fibrinolysin bei Staph.-Kulturen vom Menschen und von Tieren wurden in mehreren Veröffentlichungen unterschiedliche Angaben gemacht (Tabelle III).

Bei eigenen Untersuchungen konnten unter 790 Staph.-Kulturen vom Rind 42 (5,3 %), bei 250 vom Menschen 40 (16 %) und bei 22 vom Hund 11 (50 %) fibrinolysin-negative Staphylokokken gefunden werden. Der Anteil der fibrinolysin-positiven Staphylokokken vom Rind stimmt weitgehend mit den Angaben von GEORGE et al.²⁴ überein, die bei 5,5 % der Staphylokokken vom Rind Fibrinolysin fanden. Dagegen wurde bei den Staphylokokken vom Menschen eine niedrigere Prozentzahl fibrinolysin-positiver Sta-

Tabelle III

Literaturangaben über die Häufigkeit
fibrinolysin-positiver Staphylokokken
bei Mensch und Tier

Autoren	Zahl der fibrinolysin-positiven Staphylokokken-Kulturen	
	vom Menschen	von Tieren
TILLET u. GARNER ⁵¹	-	3 (16,7%)
AOI ²	89 (88,1%)	-
CHRISTIE u. WILSON ¹³	92 (65,2%)	5 (8,8%)
CHAPMAN ⁹	73 (59,8%)	-
CHRISTIE et al. ¹²	651 (95,0%)	9 (7,7%)
ROUNTREE ⁴⁵	31 (90,0%)	-
SMITH ⁴⁸	-	61 (55,5%)
ELEK ¹⁸	179 (81,0%)	22 (38,0%)
GEORGE et al. ²⁴	-	38 (5,5%)
KAFFKA ²⁹	267 (96,4%)	-

phylokokken ermittelt. Sie betrug nur 41 % und lag damit unter den Prozentzahlen, die von anderen Autoren angegeben worden waren, z.B. 59,8 % (CHAPMAN⁹) und 96,4 % (KAFFKA²⁹).

Auffällig war der hohe Anteil fibrinolysin-positiver Staphylokokken bei den Staph.-Kulturen vom Hund. Er betrug 50 % der untersuchten Kulturen. SMITH⁴⁸ fand bei einer ähnlichen Anzahl von Staph.-Kulturen 100 % fibrinolysin-positive Staphylokokken. Ungeklärt bleibt dabei, warum gerade beim Hund ein so großer Anteil fibrinolysin-positiver Staphylokokken zu finden ist.

Für den Nachweis von Fibrinolysin war es von großer Bedeutung, ein Medium zu finden, das nicht nur einfach herzustellen war, sondern das sich auch für den Aktivitätsnachweis von schwach fibrinolytischen Kulturen eignete.

Die Nachweismethoden von TILLET und GARNER⁵¹ und FISHER²⁰ reichten für die Fibrinolysinbestimmung nicht aus, da oft zweifelhafte Reaktionen auftraten. Außerdem war bei der Benutzung von Plasma immer die Möglichkeit gegeben, daß fibrinolysinhemmende Antikörper vorhanden sein konnten. Dasselbe traf auch für den Plattentest von CHRISTIE und WILSON¹³ und CHAPMAN⁹ zu. In dieser Arbeit wurde durch Benutzung gereinigten Fibrinogens das Plasma weitgehendst ersetzt. Die Zugabe von Kaninchenplasma als Cofaktor zur Fibrinogenlösung bis zu einer Endkonzentration von 2 % war sicherlich so gering, daß auch bei einem möglichen Vorhandensein von Antikörpern die Reaktionen nicht beeinflußt werden konnten. Außerdem war das Medium ohne größere Schwierigkeiten herzustellen, wenn Agar und Fibrinogenlösung genau bei 56 C gemischt wurden, und dann bei beginnender Trübung die Mischung ohne Verzug in Petrischalen ausgegossen wurde.

Die für die Fibrinolysinuntersuchung zusammengestellten Rinderplasmamedien und Fibrinogen-Koagulasemedien waren

wegen ihrer starken Trübung für den Fibrinolysinnachweis bei schwach fibrinolytischen Stämmen ebenfalls gut geeignet. Jedoch stellten sich oft Schwierigkeiten bei der Herstellung dieser Medien ein.

Zur quantitativen Fibrinolysinbestimmung eignete sich gut eine Fibrinogenlösung, der eine bestimmte Menge angereicherter Koagulase zugesetzt worden war. Die Koagulation des Fibrinogens war bedeutend leichter zu erkennen als die Koagulation der Plasmalösung, die TILLET und GARNER⁵¹ in ihrem Röhrchentest verwandt hatten. Außerdem konnten durch die Verwendung desselben Fibrinogens gleiche Substratbedingungen für alle Untersuchungen gewährleistet werden.

Alle fibrinolysin-positiven Staph.-Kulturen wurden auf Koagulaseaktivität und Mannitvergärung geprüft. Hierdurch sollten die Staphylokokken herausgefunden werden, die die Merkmale von Staph. aureus hatten. Leider fehlen in den meisten bisher veröffentlichten Untersuchungen ähnliche Angaben über die Staphylokokken. So könnte es sein, daß von anderen Autoren verschiedene Staphylokokkenarten untersucht worden sind, wodurch die unterschiedlichen, ja oft gegensätzlichen Befunde erklärt werden könnten.

Bei den Untersuchungen wurde besonderes Augenmerk auf das gemeinsame Vorkommen von Fibrinolysin und Koagulase einerseits und Fibrinolysin und β -Hämolysin andererseits gerichtet, weil jeweils zwischen diesen Merkmalen besondere Beziehungen vermutet wurden (GRATIA²⁷, GENGOU²³, ROUNTREE⁴⁵). Auffallend war, daß eine größere Anzahl der mannitvergärenden Staphylokokken im Röhrchentest koagulase-negativ war. Demgegenüber waren die meisten mannit-positiven Staphylokokken im Objektträgerstest auch koagulase-positiv. Durch Verdünnungsversuche konnten die abweichenden Ergebnisse des Röhrchentests auf die Fibrinolysinwirkung zurückgeführt werden. Beim Objektträgerstest trat die Koagulasewirkung so schnell ein, daß es nicht zur Fibrinolysinwirkung kommen konnte. Bei den fibrinolysin-

positiven Staphylokokken trifft wahrscheinlich nicht die angebliche Übereinstimmung (BERGER³, WILLIAMS u. HARPER⁵³, SMITH⁴⁸) von Koagulase im Röhrchen- und Objektträgerstest zu. Bei den heute routinemäßig vorgenommenen Koagulaseuntersuchungen kann es also durchaus vorkommen, daß durch den Röhrchentest nicht alle koagulase-positiven Staphylokokken erkannt werden, zumal in den wenigsten Fällen die Kulturen auch auf Mannitvergärung untersucht werden.

Die fibrinolysin-positiven Staphylokokken wurden auf β -Hämolysin untersucht, da von verschiedenen Autoren (CHRISTIE u. WILSON¹³, ROUNTREE⁴⁵) bei β -hämolytischen Staphylokokken keine Fibrinolysinaktivität beobachtet worden war. Für die Staphylokokken vom Menschen könnten diese Beobachtungen zutreffen, da die β -Hämolyse bei diesen Staphylokokken ohnehin selten vorkommt. Wie die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, war die Fibrinolysinsbildung bei β -hämolytischen Staphylokokken von Rind und Hund dagegen häufig. Beim Rind waren 35,7 % der fibrinolysin-positiven Staphylokokken auch β -hämolytisch, beim Hund betrug der Anteil sogar 90,9 %. Aus diesen Ergebnissen ging klar hervor, daß β -Hämolysin und Fibrinolysin sich nicht ausschlossen oder gegenseitig hemmten.

Recht unterschiedliche Angaben wurden in der Literatur über die Fibrinolysinaktivität während einer längeren Bebrütungsdauer gemacht. FISHER²⁰ sah die stärkste Fibrinolysinaktivität vom 5. bis 14. Bebrütungstag. PILLET et al.⁴¹ beobachteten die stärkste Fibrinolysinaktivität nach 9tägiger Bebrütung. Durch Benutzung von Metallzylindern konnte auf dem Fibrinogenagar festgestellt werden, daß bei den untersuchten Staph.-Kulturen die größte Aktivität schon am 2. Bebrütungstag vorhanden war (Abb. 8). Auffallend war, daß bei allen untersuchten Kulturen nach 3 bis 4tägiger Bebrütung für etwa 3 Tage kein Fibrinolysin nachzuweisen war. Der Fibrinolysinnachweis in diesem Zeitraum könnte deshalb zu völlig falschen Ergebnissen führen. Das vorübergehende Verschwinden der Fibrinolysinaktivität in der Kultur könnte vielleicht dadurch erklärt werden, daß während

dieser Zeit in der Bouillonkultur Hemmsubstanzen gegen die Fibrinolysinaktivität wirksam waren.

SMITH⁴⁸ sprach sich gegen den Fibrinolysinnachweis durch den Plattentest von CHRISTIE und WILSON¹³ aus, da nach seiner Meinung für die Erkennung der Fibrinolyse eine Bebrütung von 48 Stunden nötig war. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß die stärkste Zunahme der Aufhellungszonen auf Fibrinogenmedium schon bei einer Bebrütung von 3 bis 8 Stunden zu verzeichnen war. Für die meisten Staphylokokken reichte also eine 8 bis 10stündige Diffusionszeit aus. Entgegen früheren Berichten (KLEINSCHMIDT³⁰, GENGOU²³, FISHER²⁰) konnten bei der Prüfung von Zentrifugaten und Filtraten (Seitz- und Milliporefilter) fibrinolysin-positiver Bouillonkulturen keine Unterschiede in der Aktivität nachgewiesen werden. Die von AOI² beobachtete Absorption des größeren Anteils von Fibrinolysin wurde bei den in dieser Arbeit benutzten Filtern nicht beobachtet. Demzufolge ist die Sterilisierung von Fibrinolysinlösungen durch Filtration ohne Aktivitätsverlust möglich.

Die Anreicherung von Fibrinolysin wurde von mehreren Autoren unter Verwendung verschiedener Methoden versucht. Besondere Schwierigkeiten machte die Trennung von Koagulase und Fibrinolysin. AOI² und FISHER²⁰ gelang eine Fibrinolysinanreicherung durch Ausfällung von Kulturüberständen mit gleichen Mengen von Aceton oder Alkohol. PILLET et al.⁴¹ erzielten eine Fibrinolysinanreicherung durch Ausfällung mit Trichloressigsäure. Da diese Anreicherungsverfahren im eigenen Versuch nicht befriedigend waren, wurde nach einer erfolgreicherer Methode gesucht. Um das Problem der Koagulase-Fibrinolysintrennung zu umgehen, wurde für die Anreicherung eine Staph.-Kultur ausgewählt, bei der keine Koagulase nachweisbar war. Eine Anreicherung von Fibrinolysin gelang durch Ausfällung des Bouillonkultur-Zentrifugates mit Ammoniumsulfat. Hierzu war die vollständige Sättigung des Überstandes mit Ammoniumsulfat notwendig.

Zur Antikörperstimulierung wurde das durch Ammoniumsulfat angereicherte Fibrinolysin 4 Kaninchen in wöchentlichem Abstand eingespritzt. Der Antikörperrnachweis im Serum wurde zuerst mit den in der Literatur angegebenen Methoden versucht (ELEK¹⁸). Dabei konnte eine Hemmung der Fibrinolyse-wirkung durch das Antiserum der behandelten Kaninchen nachgewiesen werden. Gleichzeitig trat aber auch eine ähnliche, wenn auch etwas schwächere Hemmung der Aufhellungs-zonen durch die Kontrollseren auf. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von ELEK¹⁸ mußten demnach im Normalserum fibrinolysinhemmende Substanzen vorhanden sein. Deutliche Antigen-Antikörperreaktionen zwischen Antiserum und Fibrinolysin konnten im Ouchterlony-Präzipitationstest nachgewiesen werden. Präzipitationslinien traten bei dem homologen und mehreren heterologen fibrinolysin-positiven Staph.-Kulturen auf. Bei den zur Kontrolle verwendeten, in ähnlicher Weise wie zur Fibrinolysinanreicherung behandelten, fibrinolysin-negativen Staph.-Kulturen traten keine Präzipitationslinien auf. Diese fehlten auch zwischen den Kontrollseren und dem angereicherten Fibrinolysin.

Ob nun und welche Präzipitationslinien der Fibrinolysin-Antifibrinolysin-Reaktion entsprechen, ist noch nicht bekannt.

6,0 Zusammenfassung

Von 6 untersuchten Agarmedien eignete sich für den Fibrinolysinnachweis am besten ein Fibrinogenagar, der mit einer Rinderfibrinogen-Kaninchenplasma-Lösung hergestellt worden war. Für die quantitative Fibrinolysinbestimmung wurde eine neue Methode entwickelt. Eine Rinderfibrinogen-Kaninchenplasma-Lösung wurde hierzu mit angereicherter Koagulase versetzt. In dieser Indikatorlösung wurden 2fache Verdünnungen des Fibrinolysins 3 Stunden bei 37 C bebrütet.

Von 790 untersuchten Staph.-Kulturen vom Rind waren 42 (5,3 %) fibrinolysin-positiv, von 250 vom Menschen 40 (16 %) und von 22 vom Hund 11 (50 %). Von den 42 fibrinolysin-positiven Kulturen vom Rind waren 26 (61,9 %), von den 40 Kulturen vom Menschen 28 (70 %) und von den 11 Kulturen vom Hund 9 (81,8 %) mannit-positiv und in mindestens einer Koagulaseprobe (Röhrchen- oder Objektträger-test) positiv. Die Koagulasureaktionen im Röhrchentest wurden in einigen Fällen durch Fibrinolysin verhindert.

Untersuchungen über Beziehungen von Fibrinolysin und β -Hämolysin ergaben, daß bei den Staphylokokken vom Menschen beide Merkmale nur bei einer von 40 Kulturen vorkamen. Bei den fibrinolysin-positiven Staphylokokken vom Rind hingegen waren von 42 Kulturen 15 und beim Hund von 11 Kulturen 10 β -hämolytisch. Damit wurde gezeigt, daß Fibrinolysin und β -Hämolysin sich nicht gegenseitig ausschlossen.

Bei allen untersuchten Staph.-Kulturen war die Fibrinolysinaktivität am 2. Bebrütungstag am stärksten. Darüber hinaus zeigte sich nach 3 bis 4tägiger Bebrütung ein vollständiger Abfall der Fibrinolysinaktivität für 3 Tage. Danach stieg die Fibrinolysinaktivität wieder an und war noch nach 20tägiger Bebrütung nachweisbar.

Versuche, Fibrinolysin durch Alkohol, Aceton oder Trichlor-essigsäure anzureichern, waren erfolglos. Dagegen gelang eine etwa 60fache Anreicherung von Fibrinolysin nach vollständiger Sättigung des Kulturüberstandes mit Ammoniumsulfat.

Durch Impfung mehrerer Kaninchen mit angereichertem Fibrinolysin wurde eine Antikörperstimulierung versucht. Die entsprechenden Antiseren bedingten Hemmzonen und Präzipitationslinien mit dem angereicherten Fibrinolysin, deren Identität als Fibrinolysin-Antifibrinolysin-Reaktion jedoch noch nicht feststeht.

7,0 Literaturverzeichnis

1. ANDERSON, K. A survey of toxicity in staphylococci.
J. clin. Path. 9/257-260 (1956)
2. AOI, F. On the fibrinolysis of the staphylococcus.
Kitasato Arch. exp. Med. 9/171-208 (1932)
3. BERGER, F. M. Clumping of pathogenic staph. in plasma.
J. Path. Bact. 55/435-440 (1943)
4. BIRSCH-HIRSCHFELD, L. Die sekretorische Staphylokokkenproteinase und ihre Beziehung zu den plasma-wirksamen Stoffen pyogener Staphylokokken.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 145/476-500 (1940)
5. BLAIR, J. Factors determining the pathogenicity of staphylococci.
Ann. Rev. Microbiol. 12/499-500 (1958)
6. BLOBEL, H.;
BERMAN, D. u.
SIMON, J. Purification of staph.-coagulase.
J. Bact. 79/807-815 (1959)
7. BREED, S. R.;
MURRAY, E. G. D. u.
SMITH, M. R. Bergey's manual of determinative bacteriology.
7th edition.
The Williams & Wilkins Company, Baltimore (1957)
8. BRYCE, L. u.
ROUNTREE, P. M. The production of β -toxin by staphylococci.
J. Path. Bact. 43/173-189 (1936)
9. CHAPMAN, G. H. Lysis of precipitated fibrinogen in agar medium by staphylococci.
J. Bact. 43/313-314 (1941)
10. CHRISTENSEN, L. R. Streptococcal fibrinolysis:
A proteolytic reaction due to a serum-enzyme activated by streptococcal fibrinolysin.
J. gen. Physiol. 28/363-375 (1959)

11. CHRISTIE, R.;
GRAYDON, J. u.
WOODS, E. F. Staphylococcal fibrinolysin.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci.
23/127-130 (1945)
12. CHRISTIE, R.;
NORTH, E. A. u.
PARKIN, B. J. Criteria of pathogenicity in
staphylococci.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci.
24/73-78 (1946)
13. CHRISTIE, R. u.
WILSON, H. A test of staphylococcal fibrino-
lysis.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci.
19/329-332 (1941)
14. DARANYI, J. Pathogenität und Einteilung der
Staphylokokken.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 99/74-
79 (1926)
15. DENEKE, A. u.
BLOBEL, H. Fibrinogen-medium for studies on
staphylococci.
J. Bact. 83/533-537 (1962)
16. DUTHIE, E. S. u.
LORENZ, L. Staphylococcal coagulase:
mode of action and antigenicity.
J. gen. Microbiol. 7/320-326
(1952)
17. EDSALL, J. T. The plasma proteins and their
fractionation.
Advanc. Protein Chem. 3/383-473
(1947)
18. ELEK, St. D. Staphylococcus pyogenes.
E. & S. Livingstone LTD,
Edinburgh and London (1959)
19. ELEK, St. D. u.
LEVY, E. Distribution of haemolysins in
pathogenic and non-pathogenic
staphylococci.
J. Path. Bact. 62/541-554 (1950)
20. FISHER, A. M. The fibrinolytic properties of
staphylococci.
Bull. Johns Hopk. Hosp. 109/415-
426 (1936)
21. FISHER, A. M. The plasma coagulating properties
of staphylococci.
Bull. Johns Hopk. Hosp. 59/393-
414 (1936)

23. GENGOU, O. Contribution à l'étude de l'action du Staph. sur le plasma oxalaté et sur le fibrinogène. Ann. Inst. Pasteur 51/14-34 (1933)
24. GEORGE, St. CH.;
RUSSELL, K. E. u.
WILSON, J. B. Characteristics of staphylococci from bovine milk. J. infect. Dis. 110/75-79 (1962)
25. GERHEIM, E. B.;
FERGUSON, J. H.;
TRAVIS, B. L.;
JOHNSTON, C. L. u.
BOYLES, P. A. Staphylococcal fibrinolysis. Proc. Soc. exp. Biol. 68/246-248 (1948)
26. GONZENBACH, W. u.
UEMURA, H. Beitrag zur Gerinnung von Plasma durch Wirkung des Staph. aureus. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 78/97-103 (1916)
27. GRATIA, A. Action fibrinolytique du Staphylocoque. Arch. int. Physiol. 18/355-357 (1921)
28. GRÜN, L. Staphylokokken in Klinik und Praxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1964)
29. KAFFKA, A. Erfahrungen mit einfachen Untersuchungsmethoden zum Nachweis von Hyaluronidase, Fibrinolysin und Phosphatase bei Staphylokokken. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 168/381-385 (1957)
30. KLEINSCHMIDT, H. Fibrinbildende und -auflösende Wirkung der Staphylokokken. Z. Immun.-Forsch. 3/516-524 (1909)
31. KLINE, L. D. Enzymes in blood clotting. In: COLOWICK-KAPLAN, Methods in Enzymology 2/139-166 (1955)
32. LACK, CH. Staphylokinase: an activator of plasma protease. Nature 161/559-560 (1948)

33. LACK, CH. Plate coagulase and fibrinolysin-tests for staphylococci.
J. clin. Path. 10/208-210 (1957)
34. LOEB, L. The influence of certain bacteria on the coagulation of blood.
J. med. Res. 10/407-419 (1903)
35. LOWRY, O. H.;
ROSEBROUGH, N. J.;
FARR, A. L. u.
RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. biol. Chem. 193/265-275 (1951)
36. MADISON, R. R. Fibrinolytic staphylococci.
Proc. Soc. exp. Biol. 33/209-211 (1935)
37. MADISON, R. R. u.
DART, E. F. Veterinary staphylo-fibrinolysin.
Proc. Soc. exp. Biol. 34/299-300 (1936)
38. MEYER, W. Die Staph.-Erkrankungen des Menschen.
Johann Ambrosius-Verlag, Leipzig (1962)
39. MUCH, H. Über eine Vorstufe des Fibrin-fermentes in Kulturen von Staph. aureus.
Biochem. Z. 14/143-155 (1908)
40. NETER, E. Fibrinolytic, anticoagulating and plasma-clotting properties of staphylococci.
J. Bact. 34/243-254 (1937)
41. PILLET, J.;
MERCIER, P. u.
PERY, R. Recherches sur la fibrinolyse staphylocoque.
Ann. Inst. Pasteur 75/458-471 (1948)
42. PULVERER, G. Pathogene Staphylokokken bei Mensch und Tier sowie im Freiland. Habilitationsschrift
Medizinische Fakultät der Universität Köln (1963)
43. REIMER, K. Über charakteristische Unterschiede in der gerinnungsbeeinflussenden und fibrinauflösenden Wirkung lebender Bakterien.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 136/84-94 (1936)

44. ROEMER, G. B. u.
SCHMITZ, B. Untersuchungen über die Eignung verschiedener Methoden zur Differenzierung pathogener und apathogener Staphylokokken.
Arch. Hyg. 135/274-285 (1951)
45. ROUNTREE, P. M. Some observations on fibrinolysin and β -toxin of staphylococci.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 25/359-361 (1947)
46. SASAKI, S u.
FEJGIN, B. Au sujet des propriétés protéolytiques et fibrinolytiques de Staph. en connexion avec leur pouvoir toxigène.
C. R. Soc. Biol. 126/139-141 (1937)
47. SELA, M. u.
KATCHALSKI, F. Biological properties of poly-alpha-amino acids.
Advanc. Protein Chem. 14/391-469 (1959)
48. SMITH, H. W. The examination of staphylococci of animal origin with particular regard to the determination of criteria of pathogenicity.
J. comp. Path. 57/98-115 (1947)
49. SMITH, H. W. The pathogenicity and haemolytic properties of staphylococci, isolated from chickens.
J. Path. Bact. 67/73-77 (1957)
50. SMITH, H. W. u.
HALE, J. H. The nature and mode of action of staph.-coagulase.
Brit. J. exp. Path. 25/101-109 (1944)
51. TILLET, W. S. u.
GARNER, P. D. The fibrinolytic activity of haemolytic streptococci.
J. exp. Med. 58/485-502 (1933)
52. VAN BREUSEGHEM, C. R. Coagulation et fibrinolyse du plasma et du fibrinogène par le staphylocoque et sa staphylocoagulase.
C. R. Soc. Biol. 116/344-346 (1934)
53. WILLIAMS, R. E. O. u.
HARPER, G. J. Determination of coagulase and alpha-haemolysin production by staphylococci.
Brit. J. exp. Path. 27/72-81 (1946)

Anhang

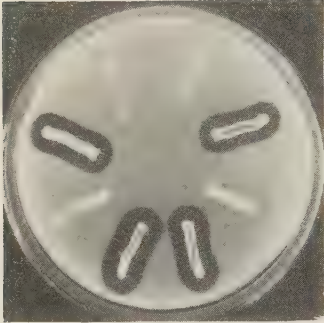


Abb.1 Fibrinolysinnachweis bei
Staphylokokken auf Fibrino-
genagar

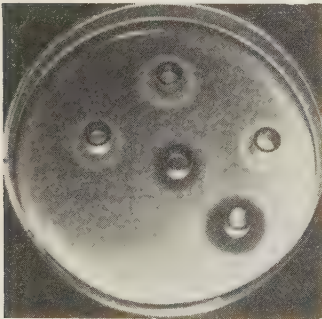


Abb.2 Fibrinolysin- und Koagulase-
darstellung von Staph.-
Bouillonkultur-Zentrifugaten
mit Metallzylindern auf Fibri-
nogenagar

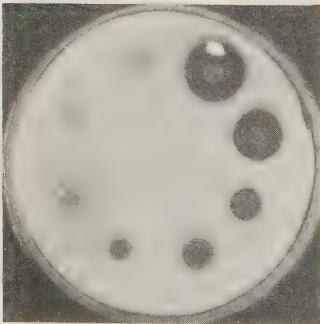


Abb.3 Quantitative Fibrinolysin-
bestimmung mit dem Plattentest
auf Fibrinogen-Koagulaseagar

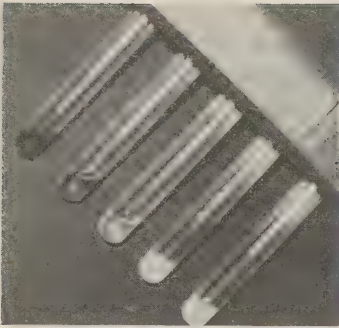


Abb.4 Quantitative Fibrinolysinbestimmung mit dem Röhrchentest in einer Fibrinogen-Koagulase-lösung

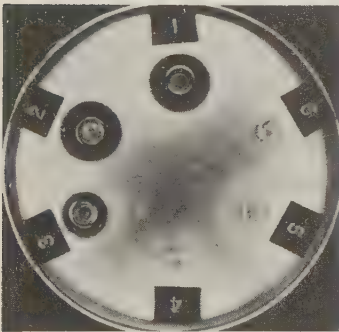
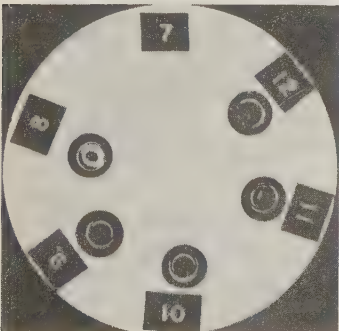


Abb.9 Fibrinolysinaktivität einer Staph.-Kultur während 12 Tagen bei 37 C auf Fibrinogen-agar (die angegebenen Zahlen entsprechen den einzelnen Tagen)



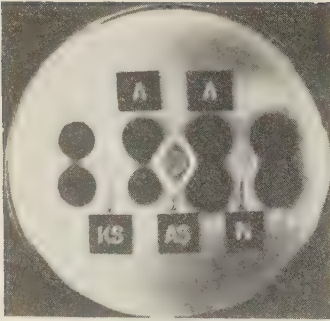


Abb.10 Hemmung der Fibrinolyse durch
Antiserum und Kontrollserum

A = Antigen (Fibrinolysin)
AS = Antiserum
KS = Kontrollserum
N = physiol. NaCl



Abb.11 Präzipitationslinien im Ouchterlony-Test zwischen
Antiserum und homologer Fibrinolysinlösung

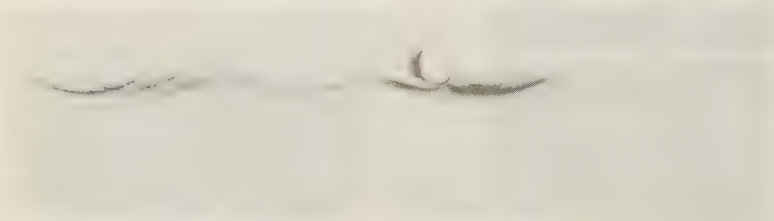


Abb.12 Elektrophoretische Trennung der Fibrinolysin-
anreicherung mit anschließender Immunodiffusion

Nach Abschluß der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Blobel für die freundliche Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit sehr herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Tolle und Herrn Dr. Heeschen, Institut für Milchhygiene, Kiel, sowie Herrn Regierungsveterinär Dr. Kielwein, Tierärztliches Untersuchungsamt, Aulendorf, für die Zusendung von Untersuchungsmaterial.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Ulbrich, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Gießen, und Herrn Prof. Dr. Kemkes, Institut für Medizinische Hygiene, Gießen, für die Überlassung von Untersuchungsmaterial.

L e b e n s l a u f

Am 10. Februar 1939 wurde ich als Sohn des Studienrats Fritz Hentschel und seiner Ehefrau Erna, geb. Dechow, in Wissen/Sieg geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Altenkirchen/Ww. trat ich im Herbst 1949 in das dortige Neusprachliche Gymnasium ein, wo ich im Frühjahr 1959 die Reifeprüfung bestand.

Anfang April 1959 wurde ich zur vorzeitigen Ableistung meines Wehrdienstes nach Koblenz eingezogen. Nach Absolvierung von Grundwehrdienst, Offizierschule und Truppendienst wurde ich im September 1960 als Leutnant d. Res. aus der Bundeswehr entlassen.

Im Wintersemester 1960/61 begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Während der Semesterferien wurde ich zu mehreren Wehrübungen eingezogen und im Juli 1964 zum Oberleutnant d. Res. ernannt. Im Juli 1965 bestand ich die Tierärztliche Prüfung.

Nach Beendigung meiner Veterinärpraktikantenzeit bei Herrn Dr. Lennartz in Bensberg, wurde mir mit Geltung vom 1. März 1966 die Approbation als Tierarzt erteilt. Seit dem 1. April 1966 bin ich im Institut für Bakteriologie und Immunologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen als Verwalter einer wiss. Assistentenstelle beschäftigt.

